

Aus der Klinik für Kleintiere  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Einfluss eines Inhibitors der Glutaminylzyklase auf die in-Stent Restenose  
im atherosklerotischen Kaninchenmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Vera Nykiel  
aus Gladbeck

Leipzig, 2017

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Walter Brehm

Betreuer: Prof. Dr. Gerhard Oechtering

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth  
Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI  
Außenstelle Molekulare Wirkstoffbiochemie und Therapieentwicklung  
Halle

Prof. Dr. Gerhard Oechtering  
Klinik für Kleintiere  
Veterinärmedizinische Fakultät  
Universität Leipzig

Prof. Dr. Stephan von Hörsten  
Experimentell-Therapeutische Abteilung im Virologischen Institut  
Universitätsklinikum Erlangen  
Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der Verteidigung: 25.04.2017

Diese Dissertation wurde angefertigt im  
Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI,  
Außenstelle Molekulare Wirkstoffbiochemie und Therapieentwicklung MWT, Halle

## **Meinen Eltern**



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 EINLEITUNG &amp; FRAGESTELLUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Atherosklerose .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Anatomie der Arterie .....	2
2.1.2 Erkrankungsformen der Arteriosklerose.....	3
2.1.3 Pathomechanismus.....	4
2.1.4 Bedeutung von CCL2 bei der Atherosklerose .....	5
2.1.5 Atherosklerose in der Veterinärmedizin .....	6
2.1.6 Perkutane Transluminale Angioplastie .....	7
<b>2.2 In-Stent Restenose .....</b>	<b>8</b>
2.2.1 Bare Metal Stents .....	8
2.2.2 Drug Eluting Stents.....	8
2.2.3 Einfluss der Stentbeschaffenheit auf die Restenosewahrscheinlichkeit .....	9
2.2.4 Pathogenese der in-Stent Restenose.....	9
2.2.5 Bedeutung von CCL2 bei der in-Stent Restenose.....	10
2.2.6 CCL2-Rezeptor-Interaktion .....	10
<b>2.3 Funktion und Inhibition von Glutaminylzyklasen .....</b>	<b>11</b>
2.3.1 Glutaminylzyklasen .....	11
2.3.2 Funktion der isoGlutaminylzyklase bei der CCL2-Reifung .....	11
2.3.3 Inhibition der Glutaminylzyklasen .....	13
2.3.4 Inhibition durch MWT-S-17 und MWT-S-18 .....	13
<b>2.4 Tiermodelle .....</b>	<b>14</b>
2.4.1 Anforderungen an das Tiermodell .....	14
2.4.2 Schweinmodell.....	14
2.4.3 Kaninchenmodell .....	15
<b>2.5 Ziele der Arbeit.....</b>	<b>17</b>

<b>3</b>	<b>MATERIAL, TIERE &amp; METHODEN.....</b>	<b>18</b>
3.1	<b>Materialien .....</b>	<b>18</b>
3.2	<b>Tiere .....</b>	<b>18</b>
3.2.1	Versuchstiere.....	18
3.2.2	Fütterung .....	18
3.2.3	Haltungsbedingungen .....	18
3.2.4	Hygienemanagement.....	19
3.2.5	Aufbau der Tierversuche.....	19
3.3	<b>Methoden.....</b>	<b>20</b>
3.3.1	Herstellung der Kaninchen-QC <i>in vitro</i> .....	20
3.3.2	Charakterisierung von MWT-S-17 und MWT-S-18 <i>in vitro</i> .....	26
3.3.3	Tierversuch <i>in vivo</i> .....	29
3.3.4	Histopathologische Präparation <i>ex vivo</i> .....	39
3.3.5	Biochemische Untersuchungen <i>ex vivo</i> .....	48
3.3.6	Statistische Auswertung.....	53
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>54</b>
4.1	<b><i>In vitro</i> Versuche.....</b>	<b>54</b>
4.1.1	Herstellung der Kaninchen-QC.....	54
4.1.2	Charakterisierung von MWT-S-17 und MWT-S-18 <i>in vitro</i> .....	54
4.2	<b>Pharmakokinetik .....</b>	<b>56</b>
4.2.1	Quantifizierung von MWT-S-17 und MWT-S-18.....	56
4.2.2	Vehikel- und Inhibitorselektion .....	59
4.2.3	Modelletablierung .....	60
4.2.4	Wirkstoffprofil .....	61
4.3	<b>Blutuntersuchungen .....</b>	<b>62</b>
4.3.1	Kleine Blutbilder.....	62
4.3.2	CCL2-Konzentration im Serum.....	63
4.3.3	Serumcholesterin und LDL-Konzentration.....	63
4.4	<b>Histopathologische Auswertung.....</b>	<b>65</b>
4.4.1	Sektionen.....	65
4.4.2	Histologie .....	67

<b>4.5</b>	<b>Biochemische Untersuchungen <i>ex vivo</i> .....</b>	<b>70</b>
4.5.1	Kalibriergerade .....	70
4.5.2	Berechnung der spezifischen QC-Aktivität .....	70
4.5.3	Vergleich der spezifischen QC-Aktivität .....	72
4.5.4	Quantitative Echtzeit-PCR .....	73
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>74</b>
5.1	Glutaminylzyklasen als Zielenzyme in der Wirkstoffforschung .....	74
5.2	Unterschiedliche ISR Kaninchenmodelle in der Literatur .....	76
5.3	Inhibitorauswahl .....	78
5.4	Orale Behandlung mit MWT-S-17 .....	82
5.5	Kritische Betrachtung des verwendeten Tiermodells .....	84
5.6	Belastungseinschätzung .....	86
5.7	Verendete Tiere und Einfluss der symptomatischen Behandlung .....	88
5.8	Interpretation der Versuchsergebnisse .....	90
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>96</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>9-1</b>
9.1	Materialien .....	9-1
9.2	Bearbeitung der histologischen Bilder .....	9-12
9.3	Kleine Blutbilder .....	9-13
9.4	Scoresheet .....	9-16
9.5	Analytik der Pharmakokinetikstudie .....	9-18
9.6	Biochemische <i>ex vivo</i> Untersuchungen .....	9-20
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BMS	„Bare Metal Stent“
BSA	Bovines Serum Albumin
cc	„comparative concentration“
CCL2	Monozyten-anlockendes Chemokin
CCR2	Chemokin Rezeptor 2
CHOP-PAP	Cholesterinoxidase-para-Aminoantipyrin
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DES	„Drug Eluting Stent“
DMEM	„Dulbecco’s Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSA	Digitale Subtraktionsangiografie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	Fetales Kälberserum
FB	„Fraction bound“
FELASA	„Federation of European Laboratory Animal Science Associations“
FU	“Fraction unbound”
ggr.	geringgradig
Gln-βNA	N-Glutaminyl-β-Naphthylamin
GRA	Granulozyten
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HCT	Hämatokrit
HDL	Lipoprotein hoher Dichte
HGB	Hämoglobin
hgr.	hochgradig

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

hisoQC	isoGlutaminylzyklase des Menschen
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
hQC	Glutaminylzyklase des Menschen
HSA	Humanes Serum Albumin
isoQC	isoGlutaminylzyklase
ISR	in-Stent Restenose
KHK	koronare Herzkrankheit
LC-MS/MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-gekoppelter Tandem-Massenspektrometrie
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte
logP	n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LYM	Lymphozyten
MAC	maximale alveoläre Konzentration
MCH	mittlere korpuskuläre Hämoglobinmenge eines Erythrozyten
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCP-1	Monozyten-anlockendes Chemokin
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
MW	Mittelwert
misoQC	isoGlutaminylzyklase der Maus
mgr.	mittelgradig
MO	Monozyten
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mQC	Glutaminylzyklase der Maus
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NZW	Weißer Neuseeländer
OT	Objektträger
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pGAP	Pyroglutamyl-Aminopetidase
pGlu	Pyroglutamyl

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

pGlu-βNA	Pyroglutamyl-β-Naphthylamin
PI	Protease Inhibitor-Tabletten
PK	Pharmakokinetikstudie
pK <sub>a</sub>	Säurekonstante
PTA	Perkutane transluminale Angioplastie
QC	Glutaminylzyklase
qRT-PCR	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RBC	Erythrozyten
rCCL2	Gen des Kaninchen-CCL2
rHPRT	Gen der Kaninchen-Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
risoQC	isoGlutaminylzyklase des Kaninchens
rQC	Glutaminylzyklase des Kaninchens
rQPCT	Gen der Kaninchen-Glutaminylzyklase
rQPCTL	Gen der Kaninchen-isoGlutaminylzyklase
rYWHAZ	Gen des Kaninchen-Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase aktivierenden Proteins Zeta
SD	Standardabweichung
SMC	glatte Muskelzellen
spO <sub>2</sub>	Sauerstoffsättigung
STH	„St. Thomas Hospital Rabbit“
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Trishydroxymethyl-Aminomethan
VLDL	Lipoproteine sehr niedriger Dichte
WBC	Leukozyten
WHHL	„Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit“
WHO	Weltgesundheitsorganisation
β-NA	β-Naphtylamin

# TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabellen</b>		<b>Seite</b>
Tbl. 1	PCR-Programm zur Amplifikation der Ziel-DNA für die Transformation.	20
Tbl. 2	Einbettungsprotokoll der gestenteten Gefäße in Technovit 9100.	39
Tbl. 3	Färbeprotokoll für die Giemsa-Färbung am Dünnschliff.	43
Tbl. 4	Färbeprotokoll für die modifizierte Movat-Pentachrom Färbung nach VERHOEFF am Dünnschliff.	43
Tbl. 5	Neuer Verletzungsscore.	44
Tbl. 6	Entzündungsscore.	45
Tbl. 7	Endothelialisierungsscore.	45
Tbl. 8	Erhobene Parameter der histologischen Morphometrie.	46
Tbl. 9	Ergebnisberechnung der histologisch bestimmten Daten.	47
Tbl. 10	Darstellung des HPLC-Programms zur Trennung von Gln-βNA und pGlu-βNA.	50
Tbl. 11	PCR-Programm zur Amplifikation der Ziel-DNA für die Genexpressionsanalysen.	51
Tbl. 12	Substanzvergleich von MWT-S-17 und MWT-S-18.	55
Tbl. 13	Erhobene Daten aus PK1 und PK2 von MWT-S-17 und MWT-S-18 im Vergleich.	58
Tbl. 14	Mittelwerte der kleinen Blutbilder in Bezug auf unterschiedliche Referenzwerte.	62
Tbl. 15	Interspezifischer Vergleich der Sequenzidentitäten von QC/isoQC in %.	78
Tbl. 16	Erhobene Parameter der unbehandelten Kontrollgruppen einiger ISR Kaninchenmodelle im Vergleich.	85
Tbl. 17	Benötigte Primer mit Sequenzen.	9-4
Tbl. 18	Zusammensetzung der Lösung für die Einbettung in Technovit 9100.	9-9
Tbl. 19	Lösungen und Zusammensetzungen der modifizierten Movat-Pentachrom Färbung nach VERHOEFF.	9-10

## TABELLENVERZEICHNIS

---

Tbl. 20	Lösungen und Zusammensetzungen der Giemsa-Färbung.	9-11
Tbl. 21	Ergebnisse der kleinen Blutbilder von 28 weiblichen Weißen Neuseelandkaninchen im Alter von 14 Wochen.	9-13
Tbl. 22	Ergebnisse der kleinen Blutbilder von 14 weiblichen Weißen Neuseelandkaninchen im Alter von 22 - 24 Wochen nach operati- ver Stentimplantation und 28 Tagen Cholesterindiät.	9-15
Tbl. 23	PK mit MWT-S-17 nach 2 Wochen Cholesterindiät, Tier A, B, C nach <i>i.v.</i> Applikation.	9-18
Tbl. 24	PK mit MWT-S-18 nach 2 Wochen Cholesterindiät, Tier G, H, I nach <i>i.v.</i> Applikation.	9-18
Tbl. 25	PK mit MWT-S-17 nach 6 Wochen Cholesterindiät, Tier A, B, C nach <i>i.v.</i> Applikation.	9-19
Tbl. 26	PK mit MWT-S-18 nach 6 Wochen Cholesterindiät, Tier G, H, I nach <i>i.v.</i> Applikation.	9-19
Tbl. 27	Ergebnisse der spezifischen QC-Aktivitäten in nM/min.	9-20
Tbl. 28	Ergebnisse der spezifischen QC-Aktivitäten in nmol/mg*min.	9-21
Tbl. 29	Darstellung der Referenz- und normierten Zielgene „comparative concentrations“ (cc) der qRT-PCR nach ihren Behandlungs- gruppen.	9-22



# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildungen		Seite
Abb. 1	Schematische Darstellung der CCL2-Reifung durch Zyklisierung der isoQC, sowie des Wirkmechanismus der isoQC Hemmung, modifiziert nach CYNIS et al. (2011)	12
Abb. 2	Reduktion von Resazurin (blau) zum Resorufin (pink) im Zytotoxizitätsassay.	28
Abb. 3	Angiographie bei PTA und Röntgenbild der gestenteten <i>Aa. ili-acae externa</i> .	33
Abb. 4	Einzelne Schritte der chirurgischen Präparation.	34
Abb. 5	Präparation der Aortenbifurkation und Spülung der gestenteten Gefäße <i>in situ</i> .	38
Abb. 6	Eingebettetes gestentetes Gefäß.	39
Abb. 7	Angefertigte Schnittebenen der Proben.	40
Abb. 8	Verwendete Geräte der histologischen Bearbeitung.	42
Abb. 9	Pharmakokinetik von MWT-S-17 nach <i>p.o.</i> Applikation.	57
Abb. 10	Pharmakokinetik von MWT-S-17 nach <i>i.v.</i> Applikation.	57
Abb. 11	Exemplarischer Seitenvergleich der Neointimaproliferation nach Stentimplantation mit und ohne Endotheldenudation.	60
Abb. 12	Wirkspiegel von MWT-S-17 im Serum nach oraler Applikation im 8 h Behandlungsintervall.	61
Abb. 13	Serumcholesterinwerte im Gruppenvergleich in Abhängigkeit vom Versuchszeitpunkt.	64
Abb. 14	Serum-LDL Werte im Gruppenvergleich in Abhängigkeit vom Versuchszeitpunkt.	64
Abb. 15	Hochgradige, chronisch-aktive, oberflächlich nekrotisierende und ulzerative Tracheitis mit partieller Lumenverlegung.	65
Abb. 16	Mittelgradige Leberverfettung.	66
Abb. 17	Mittelwerte der unterschiedlichen Entzündungsscores im Gruppenvergleich.	67
Abb. 18	Ausschnitt eines gestenteten Gefäßes.	67

Abb. 19	Histologische Probe der Gruppe BMS + QC-Inhibitor, niedrig.	68
Abb. 20	Bei der Morphometrie erhobene Parameter im Gruppenvergleich.	69
Abb. 21	Kalibriergerade zur Quantifizierung von pGlu-βNA mittels HPLC.	70
Abb. 22	Bestimmung der linearen Regressionsgeraden der Prednison behandelten Tiere.	71
Abb. 23	Spezifische QC-Aktivität im distalen Gefäßabschnitt in Abhängigkeit von der Behandlung.	72
Abb. 24	Relative Genexpression von CCL2, QC und isoQC in Abhängigkeit der Behandlungsgruppe, normiert auf eine Probe eines ungetesteten, unbehandelten Tieres.	73
Abb. 25	Versuchsaufbau in Wochen nach RIBICHINI et al. (2007) und MALLE (2013).	77
Abb. 26	Versuchsaufbau in Wochen nach LANGHEINRICH et al. (2005).	77
Abb. 27	Versuchsaufbau in Wochen nach CHE et al. (2016) und HAN et al. (2016).	77
Abb. 28	Ausschnitt eines interspezifischen Aminosäuren „Sequenzalignement“ von QC/isoQC.	79
Abb. 29	Aktive Zentren der übereinandergelegten Kristallstrukturen der hQC, hisoQC und mQC.	80
Abb. 30	Klinische Symptome einer systemischen Atherosklerose im Kaninchenmodell.	87
Abb. 31	Neointimafläche im Gruppenvergleich der Tiere ohne symptomatische Furosemidbehandlung.	89
Abb. 32	Gefäße mit unterschiedlichen Ausprägungen des „Neuen Verletzungsscores“.	91
Abb. 33	Vergleich von originalem und bearbeitetem Foto eines histologischen Stentquerschnitts.	9-12

# 1 EINLEITUNG & FRAGESTELLUNG

Weltweit wurden 2014 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) über 17,3 Millionen Todesfälle bei Herzpatienten registriert, was über ein Drittel der Todesursachen in den westlichen Industrienationen ausmacht. Auch in Deutschland sind Erkrankungen des Herzkreislaufsystems mit 38,9 % die häufigste Todesursache (STATISTISCHES BUNDESAMT 2014). An deren Spitze steht mit 8,2 % die koronare Herzkrankheit (KHK). Die Hauptursache der Blutunterversorgung des Herzmuskels ist die Atherosklerose. Durch diese Erkrankung kommt es stellenweise zu Gefäßwandverdickungen mit darauf folgenden Stenosen, woraufhin der Blutfluss in den betroffenen Arterien stark abnehmen kann (REINECKE et al. 2010).

Die konventionelle, minimalinvasive Therapie in der Humanmedizin ist die perkutane transluminale Angioplastie (PTA), die in fast 85 % der 2013 durchgeführten koronaren Revaskularisationen ihre Anwendung fand (BITZER et al. 2014). Durch einen arteriellen Gefäßzugang wird die Stenose mittels Ballonkatheter aufgedehnt und optional eine Gefäßstütze (Stent) implantiert, die das atherosklerotische Gefäß offen halten soll. Laut einer Metastudie der Barmer GEK (BITZER et al. 2014) kommt es aber in 20 % der Fälle bereits ein Jahr nach der Behandlung zum Gefäßwiederverschluss, der in-Stent Restenose (ISR).

Einer der postulierten molekularen Mechanismen ist die Proliferation von glatten Muskelzellen (SMC), die durch überschießende Monozyteninvasion gefördert wird (RUILE-ETZEL 2009). Diese wird durch die Freisetzung spezifischer Signalmoleküle, vor allem dem Monozyten-anlockenden Chemokin CCL2, ausgelöst (PROUDFOOT et al. 2003, LAU et al. 2004). Patienten, die nach einer PTA von einer ISR betroffen waren, wiesen im Vergleich zu operierten, nicht betroffenen Behandelten erhöhte CCL2-Konzentrationen im Plasma auf (HOKIMOTO et al. 2002, WANG et al. 2010). Die metabolische Stabilität von CCL2 wird durch das Enzym isoGlutaminylylzyklase (isoQC) vermittelt. Diese enzymatische Modifikation ist relevant für die chemotaktische Potenz und schützt CCL2 vor einem N-terminalen Abbau durch Aminopeptidasen und der somit verbundenen Inaktivierung (CYNIS et al. 2011).

Ziel dieser Arbeit war es, in einem geeigneten Tiermodell das Enzym isoQC nach Stentimplantation zu hemmen, dadurch die Konzentration von zyklisiertem CCL2 zu reduzieren und somit den potentiellen für die ISR mitverantwortlichen Wirkmechanismus der Monozyteninvasion *in vivo* zu darzustellen.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Atherosklerose

#### 2.1.1 Anatomie der Arterie

Der Wandaufbau von Arterien lässt sich in *Tunica intima*, *Tunica media* und *Tunica adventitia* unterteilen (LIEBIG 2004). Die *Tunica intima* besteht aus dem Endothel, das auf einer dünnen Bindegewebsschicht aufsitzt und eine Barrierschicht zum Blut bildet. Das Zytoplasma der Endothelzellen enthält zahlreiche pinozytotisch aufgenommene Vesikel. Zudem werden auf der Membran große Mengen unterschiedlicher Rezeptoren exprimiert. Auch die Endothelzellen selbst produzieren gefäßaktive Substanzen, die unter anderem direkt auf die unterliegenden Gefäßmuskelzellen der *Tunica media* einwirken, wodurch Gefäßwandpermeabilität und Wandtonus beeinflusst werden (KREUZER et al. 2003).

Die *Tunica media* wird auf beiden Seiten von elastischen Fasern umrahmt, die als *Membrana elastica interna* und *-externa* bezeichnet werden. Sie besteht außerdem aus zirkulär angeordneten, spindelförmigen glatten Muskelzellen (SMC), deren Anzahl bei weiter vom Herzen entfernten Arterien zunimmt (ULFIG 2011). Die SMCs regeln die Gefäßspannung und somit die Durchblutung. Des Weiteren synthetisieren sie die extrazelluläre Matrix (EZM), bestehend aus elastischen und kollagenen Fasern. Sie können in zwei verschiedenen Phänotypen vorliegen: Kontraktil oder sekretorisch. Im physiologischen Gefäßzustand weisen die meisten glatten Gefäßmuskelzellen einen differenzierten Phänotyp mit wenig sekretorischer Granula und einem hohen Gehalt an  $\alpha$ -Aktin auf. Letzteres ist die molekulare Grundlage für die Kontraktionsfähigkeit und das Ausüben mechanischer Kräfte auf die perizelluläre Matrix (HINZ 2013). Durch physiologische oder pathologische Signale von benachbarten Endothelzellen oder aktivierten Monozyten können sie ihren Phänotyp schnell und reversibel ändern (LORKOWSKI 1997). So überwiegt beispielsweise bei atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen der sekretorische Phänotyp, der die Fähigkeit hat zu proliferieren, zu migrieren und EZM zu sezernieren (EBLE et al. 2009).

Die *Tunica adventitia* stellt die Verbindung der Arterie zum umliegenden Gewebe her und wirkt durch ihren hohen Reichtum an Kollagenfasern einer Überdehnung entgegen. Bei

größeren Arterien befinden sich dort *Vasa vasorum*, kleinere Blutgefäße, die für die Eigenversorgung verantwortlich sind (WEYRAUCH et al. 2009).

### **2.1.2 Erkrankungsformen der Arteriosklerose**

Der Begriff Arteriosklerose ist ein Sammelbegriff für alle Erkrankungen, die mit Verhärtung und Verdickung der Arterienwand und einem Verlust der Elastizität einhergehen. Man unterscheidet drei verschiedene Formen (BANKL 1999).

Arteriolosklerose: degenerative Veränderung der *Tunica intima* und *Tunica media* kleiner muskulärer Arterien und Arteriolen mit Gefäßwandverdickung und Lumenverengung, die zu einer Ischämie der zu versorgenden Gebiete führen kann und regelhaft bei Hypertonie auftritt.

Mönckeberg-Mediaverkalkung: durch Degeneration der SMC mittelgroßer muskulärer Arterien charakterisiert, die mit spangenartiger Kalzifizierung einhergeht. Geringe klinische Bedeutung (*Tunica intima* bleibt intakt, keine Lumeneinengung).

Atherosklerose: chronisch-progressive, fokale-diffuse Arterienwandveränderung, deren charakteristisches Merkmal die atheromatöse Läsion (Plaque) ist (KREUZER et al. 2003). Diese besteht aus einer variablen Kombination von Intimaveränderungen: Lipidansammlungen, komplexen Kohlenhydraten, Blut- und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen (RIEDE et al. 2004). Zusätzlich auftretende Mediaveränderungen zeichnen sich durch eine Proliferation der SMC und Bildung von fibroblastischem Bindegewebe sowie nachfolgender Sklerose aus (MÖRL et al. 2000). Im fortgeschrittenen Stadium können Wandaufbrüche und thrombotische Gefäßverschlüsse die Folgen sein. Die häufigste Manifestation der Atherosklerose ist mit 32 % in den Koronararterien zu finden (HORN et al. 2011).

### 2.1.3 Pathomechanismus

Atherosklerose wird als chronisch-entzündliche, arterielle Gefäßerkrankung verstanden (LIBBY 2003), in der sich zahlreiche Parallelen zur klassischen Entzündung finden lassen (LEHR et al. 1995). Zur Beschreibung des Initialprozesses der Atherogenese, deren Ätiologie multifaktoriell bedingt ist, gibt es mehrere Theorien. ROSS formulierte 1976 die „response-to-injury“-Theorie (Theorie der Verletzungsreaktion), die auch heutzutage zum Verständnis der noch nicht vollständig geklärten Pathogenese herangezogen wird (ROSS et al. 1993). Nach dieser Theorie entstehen Endothelläsionen und damit verbunden eine erhöhte Permeabilität nach schädigenden Ereignissen, beispielsweise mechanischer Verletzung (Hypertonie, Ballondilatation) oder durch metabolische Einflüsse wie Nikotin, Diabetes mellitus oder Hyperlipidämie (HORN et al. 2011). Das Gefäßendothel antwortet mit charakteristischen Reparaturmechanismen um den entstandenen Schaden zu beheben (MEYNE 2003). Adhäsionsmoleküle induzieren die Anheftung der Monozyten an die Endothelzellen und durch Zellmediatoren kommt es zur Invasion der Monozyten in die Intima (WONISCH 2009).

Eine weitere Theorie der Atherogenese ist die sogenannte Lipidhypothese. Sie beschreibt Partikel des oxygenierten Lipoproteins niedriger Dichte (LDL) als einen wichtigen Auslöser. Nahrungslipide werden durch die Dünndarmmukosa resorbiert und in Chylomikronen eingebaut. Danach gelangen sie über die Lymphe in den Blutkreislauf und werden hydrolisiert. Auf diese Weise entstehen in der Leber Lipoproteine mit hohem Cholesterinestergehalt, unter anderem LDL (KREUZER et al. 2003). Mittels Transportproteinen wird LDL in die Peripherie transportiert, wo es an Proteoglykane der Gefäßwand binden kann und dort oxidiert wird. Durch die Oxidation des LDL wird eine Expression von Leukozytenadhäsionsmolekülen induziert, wodurch es zu einer Anlagerung von Monozyten kommt, welche anschließend beginnen in die Intima zu migrieren (STIMPEL 2001).

Der weitere Krankheitsverlauf wird in beiden Theorien homolog beschrieben: Die Monozyten, die sich an die Gefäßwand angelagert haben, dringen in die Intima ein und differenzieren zu Makrophagen (SCHMITZ et al. 2008). Gleichzeitig werden die oxidierten Lipide durch die Makrophagen phagozytiert, so dass es zur Bildung von Schaumzellen kommt (BUDDEKE et al. 2002). Diese sind mikroskopisch als gelbe Streifen an der Gefäßinnenwand identifizierbar und bereits bei Kindern unter drei Jahren in der Aorta nachweisbar (CELERMAJER et al. 1992). Auch die Proliferation sowie Transformation der SMC vom kontraktile zum sekretorischen

Phänotyp werden durch die Stoffwechselprodukte der entzündlich stimulierten Makrophagen sowie durch inflammatorische Zytokine direkt gesteuert (CAMPBELL et al. 1985, FURUKAWA et al. 1999).

#### **2.1.4 Bedeutung von CCL2 bei der Atherosklerose**

CCL2, auch MCP-1 genannt, ist ein Monozyten-anlockendes Chemokin, dessen Hauptaufgabe das Rekrutieren von Monozyten in unterschiedlichen entzündeten Geweben ist (LEONARD et al. 1990). Diese körpereigene Antwort auf inflammatorische Reize funktioniert durch das chemotaktische Potential von CCL2 und findet auch bei Atherosklerose statt (MEHRABIAN et al. 1991). Zu Beginn einer atherosklerotischen Läsion wird CCL2 vor allem durch die lokal geschädigten Endothelzellen sowie die subendothelialen Makrophagen und SMC produziert (TAKEYA et al. 1993).

LU et al. (1998) führten Versuche an genetisch veränderten Mäusen durch, bei denen das SCYA 2-Gen, das für CCL2 kodiert, ausgeschaltet wurde. Da die CCL2-Ausschüttung dadurch vollständig unterbunden wurde, waren diese Tiere nicht fähig, bei einer induzierten Entzündung Monozyten zu rekrutieren. Auch im Kaninchenmodell wurde nachgewiesen, dass die CCL2-Konzentration in atherosklerotisch veränderten Arterien signifikant höher ist als in den läsionsfreien Gefäßen (FRUEBIS et al. 1997).

Tierexperimentell wurde damit bewiesen, dass CCL2 sowohl generell bei entzündlichen Erkrankungen, als auch speziell bei der Pathogenese der Atherosklerose nach endothelialer Dysfunktion als wichtiger Initiator für die Monozytenanlockung zu sehen ist (YLÄHERTTUALA et al. 1991, GU et al. 1998). Je höher die Makrophagenkonzentration im Verhältnis zur SMC-Anzahl ist, desto instabiler wird die entstandene Plaque wodurch die Rupturgefahr steigt (DAVIES et al. 1993). Folglich könnte CCL2 in der Atherosklerose Behandlung und Vorbeugung ein potentes Molekül zur therapeutischen Beeinflussung sein (IKEDA et al. 2002).

### 2.1.5 Atherosklerose in der Veterinärmedizin

In der Tiermedizin hat die Atherosklerose eine vergleichsweise geringere Bedeutung und wird auch nur selten *intra vitam* diagnostiziert (SCHOON et al. 2015). Das liegt unter anderem daran, dass die meisten landwirtschaftlichen Nutztiere weit vor Erreichen ihres natürlichen Alters geschlachtet oder anderweitig genutzt werden (MEURER et al. 2007).

Bei Kühen tritt die Graviditätssklerose pathologisch gehäuft auf, die sich durch konzentrische Zubildungen elastischer und kollagener Fasern in den Uterinararterien manifestiert und zu Unfruchtbarkeit führen kann (BAUMGÄRTNER 2012).

Vor allem bei älteren Haustieren stellten MEURER et al. (2007) fest, dass atherosklerotische Veränderungen in Aorta, Hirn- und Koronararterien auftreten können. Auch Papageien, Greifvögel und Tauben weisen klinische Symptome auf, die von Gleichgewichtsstörungen über das Fallen von der Sitzstange bis zu plötzlichen Todesfällen reichen.

Beim Hund kommt eine milde Form der Atherosklerose häufig vor, bleibt aber meistens symptomlos. Die einzig klinisch erfassbare, in über 25 % aller alten obduzierten Hunde auftretende Form ist in den intramyokardialen kleinen Koronararterien zu finden. Diese Veränderungen scheinen relevant für die Endokardiose bedingte Herzinsuffizienz zu sein (SUTER et al. 2011). Auch bei einer hochgradigen Hypothyreose ist die Wahrscheinlichkeit für Atherosklerose in den großen Koronargefäße 51-fach höher, was einen akuten Herzinfarkt zur Folge haben kann (HESS et al. 2003). Als Prädisposition für die Ausbildung einer Atherosklerose beim Hund gilt eine andauernde Hypercholesterinämie von über 13 – 19 mmol/l (GLAUS et al. 2012). Dabei soll es rassespezifische Unterschiede geben. So wird seit der Publikation durch ZANDVLIET et al. (2005) häufig eine idiopathische Atherosklerose bei Windhunden zitiert, bei der es zu Thrombose der A. *abdominalis* mit komplettem Lumenverlust kommen kann (GLAUS et al. 2012). In dem veröffentlichten Fallbericht wurde ein 13-jähriger Afghanischer Windhund durch eine klinisch manifeste Atherosklerose auffällig, die sich symptomatisch durch intermittierendes Hinken zeigte.



### **2.1.6 Perkutane Transluminale Angioplastie**

Die Behandlung einer diagnostizierten Koronaren Herzerkrankung (KHK) beim Menschen wurde 1977 erstmals von Andreas Grüntzig durch die perkutane transluminale Angioplastie (PTA) vorgenommen. Bei dieser minimalinvasiven Technik wird ein arterieller Gefäßzugang (Schleuse) gelegt. Unter radiologischer Kontrolle kann mithilfe eines Führungsdrahtes ein Ballonkatheter bis zur Plaque vorgeschoben werden. Durch Aufdehnung des Ballons ist es möglich, das verschlossene Gefäß wieder zu eröffnen (GRÜNTZIG et al. 1977, GAEMPERLI et al. 2013). Allerdings kam es in einer von HOLMES et al. (1984) veröffentlichten Studie, in rund 30 % der Fälle bereits einige Stunden nach der Operation zu Wiederverschlüssen, Monate später zu Wiederverengungen oder Gefäßdissektionen mit meist folgendem totalen Gefäßverschluss (ROUSSEAU et al. 1987).

Aus diesem Grund begann Ulrich Sigwart 1987 metallische Gefäßstützen, sogenannte Stents, klinisch zu etablieren (SIGWART et al. 1987). Stents sollen den durch die atherosklerotische Veränderung eingeengten Gefäßquerschnitt nach Aufdehnung mechanisch offenhalten (SALAM et al. 2006). Trotzdem kann es zu einem erneuten Verlust des initialen Lumengewinns, der sogenannten in-Stent Restenose (ISR), kommen (FRANZEN et al. 1994). In der Literatur sind dafür Wahrscheinlichkeiten von 20 – 50 % angegeben (LATA CZ et al. 2004).

## **2.2 In-Stent Restenose**

### **2.2.1 Bare Metal Stents**

Trotz auftretender Restenosierungen ist eine Stentimplantation heute die Methode der Wahl zur Behandlung kurzstreckiger Stenosen in der Peripherie, sowie im Bereich der Koronararterien (HAGEMANN 2008). Laut der DEUTSCHEN HERZSTIFTUNG (2013) wurden 2012 in Deutschland 337.171 PTAs durchgeführt und dabei 302.724 Stents eingesetzt.

Der Stentkörper eines konventionellen „Bare Metal Stent“ (BMS) besteht aus Edelstahl und dient in erster Linie der physikalischen Aufrechterhaltung der durch den Ballon erzielten Arterienaufweitung, sowie der Verhinderung einer erneuten Gefäßeinengung durch die elastischen Rückstellkräfte (NEUBERT 2009). Durch die mit der PTA verbundene Gefäßwanddehnung kommt es zu einer Endothelverletzung, durch die überschießende Entzündungsreaktionen ausgelöst werden können, die eine ISR bedingen.

### **2.2.2 Drug Eluting Stents**

Um das überschießende Einwachsen des Stents zu minimieren, wurden 2002 deutschlandweit „Drug Eluting Stents“ (DES) eingeführt, die mit Zytostatika beschichtet sind (PELLEGRINI et al. 2014). 2012 wurden bei einer perkutanen koronaren Intervention in 68 % DES verwendet (DEUTSCHE HERZSTIFTUNG 2013), Tendenz steigend. Der Wirkstoff wird über mehrere Wochen hinweg gleichmäßig und kontrolliert an das umliegende Gewebe abgegeben, was einer unerwünschten Zellneubildung entgegen wirken soll.

Eine Möglichkeit ist die Beschichtung mit Rapamycin (Sirolimus). Dieser Wirkstoff wird normalerweise als Immunsuppressivum und Anti-Tumortheraeutikum eingesetzt (YANG et al. 2016). Ein anderer Wirkstoff, der zur Stentbeschichtung eingesetzt wird, ist Taxol (Paclitaxel), das den Abbau der Mikrotubuli verhindert und somit zytostatisch wirkt. SMC sollen auf diese Weise in ihrer Proliferation und Migration gehemmt werden (BESTEHORN 2001). Inzwischen werden „Drug Eluting Ballons“ entwickelt, die durch unterschiedliche Beschichtungen nach nur kurzzeitigem Kontakt mit dem Gefäßendothel die Restenose verhindern sollen (BASAVARAJIAH et al. 2014, ZHU et al. 2015).

### 2.2.3 Einfluss der Stentbeschaffenheit auf die Restenosewahrscheinlichkeit

Laut internationaler Fachliteratur gibt es Unterschiede in der Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer ISR zwischen BMS und DES (STETTLER et al. 2007, ARAKI et al. 2014). DANGAS et al. stellten 2010 fest, dass die ISR-Wahrscheinlichkeit bei DES in Abhängigkeit der Stenoseformation nur noch bei 3 – 20% liegen soll. YOSHIDA et al. verglichen 2016 die ISR-Raten nach Einsatz von BMS (22,7 %) im Gegensatz zu DES (5,4 %). NEGI et al. (2016) geben die Wahrscheinlichkeit der ISR nach Behandlung mit DES im ersten Jahr mit 4 - 8 % an.

In einer Studie der Barmer GEK wurden die 1 - Jahres Reinterventionsraten aller Patienten mit PTA zwischen 2009 und 2012 verglichen (BITZER et al. 2014). Etwa die Hälfte der Reinterventionen nach DES, BMS oder einfacher Ballondilatation trat innerhalb der ersten 60 Tage nach Therapie auf. Die ISR-Raten für den DES schwanken zwischen 20,4 - 22,2 %, knapp gefolgt von 17 - 20,6 % beim BMS. Nach fünf Jahren mussten sich 32 % der Patienten mit einem DES und 33,8 % der Patienten mit einem BMS erneut einer koronaren Revaskularisation unterziehen. Somit zeigt die Zusammenfassung über 100 randomisierter Studien der Barmer GEK, dass DES keine Vorteile gegenüber BMS haben (BITZER et al. 2014). Die über 20 Jahre zusammengestellte Meta-Analyse von TRIKALINOS et al. (2009) kommt zu dem gleichen Ergebnis..

### 2.2.4 Pathogenese der in-Stent Restenose

Generell sind als Gründe der ISR die Hyperplasie der Endothelzellen, sowie die Migration der SMC beschrieben. Die exakten Mechanismen dafür sind noch nicht aufgeklärt (KANG et al. 2012). Eine Rolle spielt die EZM-Bildung und das Wachstum der SMC, welche die Transformation vom kontraktilen zum sekretorischen Phänotyp durchlaufen und Richtung *Tunica intima* migrieren (FURUKAWA et al. 1999). So verlieren die Muskelzellen den Kontakt zur perizellulären Matrix, wodurch sich ihre Proliferation und Migration ungehemmt vollziehen kann (BENDECK et al. 1994). Nachdem die Wundoberfläche wieder vollständig von Endothelzellen bedeckt ist, beginnen mesenchymale Zellen mit der Proteoglykansynthese, die eine der Hauptkomponenten der EZM der Neointima ausmacht. Dieser Vorgang bedingt unter anderem das Remodeling, stellt also einen reaktiven, geweblichen Umbauvorgang dar, der auf pathologische Belastung oder eine Entzündung folgt (BAUTERS et al. 1997).

Der Reiz zur Neointimabildung wird vor allem durch die Ballondilatation ausgelöst. Diese korreliert auch direkt mit der Konzentration der Monozytenadhäsion und der Menge der intimalen Makrophagen im geschädigten Gefäßendothel (ROGERS et al. 1996, RUITER et al. 2015).

### **2.2.5 Bedeutung von CCL2 bei der in-Stent Restenose**

In Analogie zur Ätiologie der Atherosklerose spielen CCL2-induzierte Monozyteninvasion und Proliferation der SMC eine große Rolle bei der Entstehung der ISR. Es konnte gezeigt werden, dass die Plasmalevel von CCL2 auch drei bzw. sechs Monate nach der Behandlung mittels PTA bei den Patienten signifikant höher waren, die von einer Restenose betroffen waren (CIPOLLONE et al. 2001, IKEDA et al. 2002).

Auch die lokale CCL2-Expression hängt mit den Mechanismen des Remodellings zusammen (HOKIMOTO et al. 2002). Nach SELZMAN et al. (2002) und SCHEPERS et al. (2006) hat CCL2 einen direkten Einfluss auf die SMC. Wird die CCL2-Synthese gehemmt, zeigt sich tierexperimentell, dass die SMC-Proliferation und somit die Neointimabildung nach PTA geringer ausfällt (GRASSIA et al. 2009, FURUKAWA et al. 1999). IALENTI et al. gelang es 2011 nachzuweisen, dass eine orale Behandlung eines selektiven CCL2-Inhibitors im Schweinmodell einen Einfluss auf Neointimadicke und -fläche, sowie prozentuale Lumenstenose nach Stentimplantation hat.

### **2.2.6 CCL2-Rezeptor-Interaktion**

CCL2 bindet an den G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptor CCR2, der endogen unter anderem von Monozyten synthetisiert und auf deren Zelloberfläche exprimiert wird (WONG et al. 1997, LAU et al. 2004, SCHECTER et al. 2004). Der entstehende chemotaktische CCL2-Gradient steuert die Monozytenadhäsion und nachfolgende Makrophageninvasion.

Bei den Makrophagen, die im Prozess der Atherosklerose beteiligt sind, lässt sich eine gesteigerte Expression von CCR2 nachweisen (SCHMITZ et al. 2008). Natives LDL im Blut wirkt hierbei als positiver Verstärker, indem es die CCR2-Expression auf den Endothelzelloberflächen erhöht (HAN et al. 1998).

## **2.3 Funktion und Inhibition von Glutaminylzyklasen**

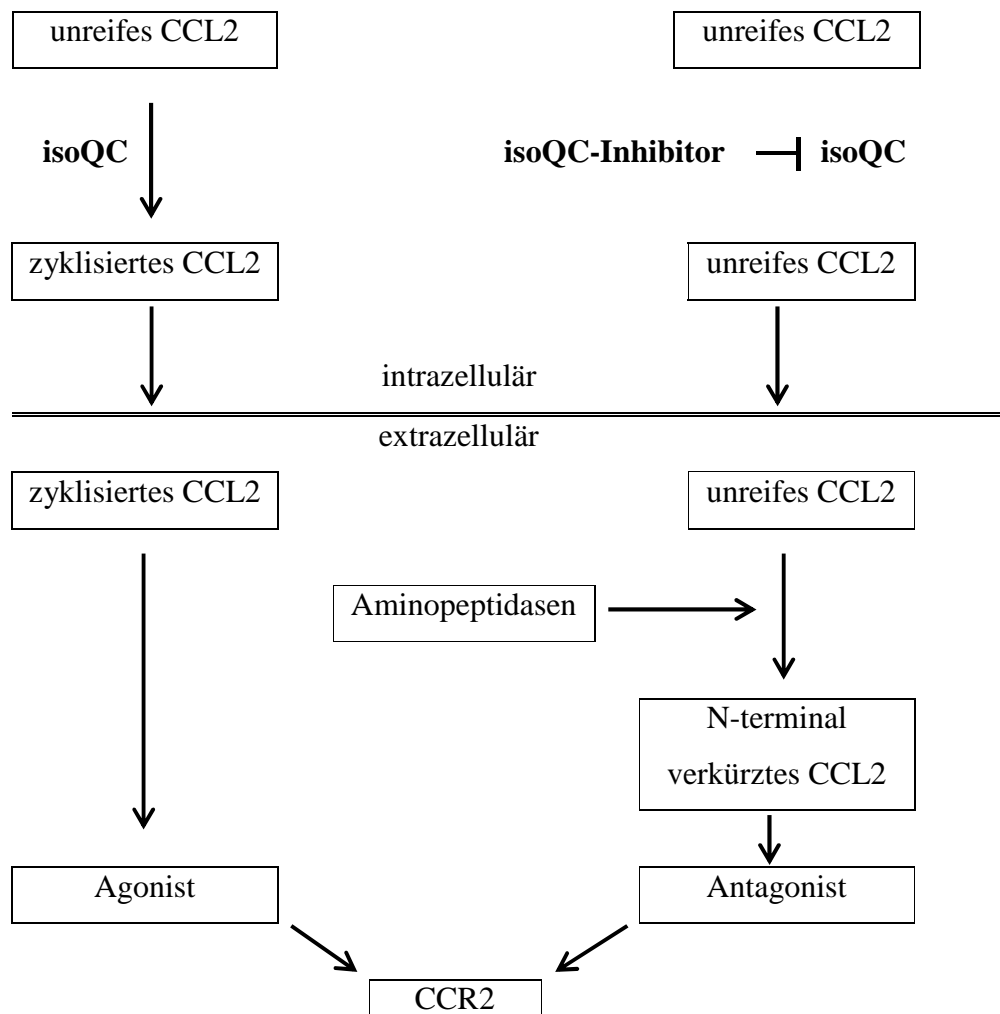
### **2.3.1 Glutaminylzyklasen**

Glutaminylzyklasen (QCs) sind zinkabhängige Metalloenzyme der Familie der Acyltransferasen, welche die Bildung von Pyroglutamyl (pGlu)-Peptiden oder -Proteinen aus N-terminalem Glutamin unter Ammoniakfreisetzung katalysieren (SCHILLING 2004). Die erste QC-Aktivität im Säuger wurde 1987 unabhängig von FISCHER et al. und BUSBY et al. in bovinen Hirnarealen sowie menschlichen B-Lymphozyten beschrieben.

Ein bis zu 45 % sequenzidentisches Isoenzym der Glutaminylzyklase (isoQC), das ausschließlich im Golgi-Apparat vorkommt, konnte ebenfalls aus verschiedenen Säugerzellen isoliert werden (CYNIS et al. 2008). Durch die QC/isoQC-katalysierte Zyklisierung verliert der N-Terminus des Signalproteins seine basischen Eigenschaften und wird gegen den Abbau durch Aminopeptidasen geschützt (SHIH et al. 2014).

### **2.3.2 Funktion der isoGlutaminylzyklase bei der CCL2-Reifung**

Die durch die Enzyme QC oder isoQC-katalysierte N-terminale Blockierung stellt einen bedeutsamen biologischen Reifungsschritt vieler Chemokine dar, da der pGlu Rest essentiell für die chemotaktische Aktivität ist (CYNIS et al. 2011). Es werden sowohl Rezeptoraktivierung als auch Signaltransduktion verbessert (VAN COILLIE et al. 1998). Auch am N-terminus von CCL2 befindet sich ein pGlu-Rest, der posttranslational durch Zyklisierung eines N-terminalen Glutaminylrestes durch die isoQC entsteht (CYNIS et al. 2011). Dieser verleiht CCL2 metabolische Stabilität und ist somit relevant für die chemotaktische Potenz (ALLEN et al. 2007). Ohne diese Modifikation kann CCL2 N-terminal von Aminopeptidasen abgebaut und dadurch inaktiviert werden. Strukturveränderte Moleküle binden noch an CCR2, lösen jedoch keine Chemotaxis aus und wirken, wie in Abbildung 1 dargestellt, entsprechend antagonistisch (PROOST et al. 1998).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der CCL2-Reifung durch Zyklisierung der isoQC, sowie des Wirkmechanismus der isoQC Hemmung, modifiziert nach CYNIS et al. (2011).** Links: Physiologischer Wirkmechanismus der CCL2-Reifung durch Zyklisierung der isoQC und Bindung als Agonist an den Rezeptor CCR2. Rechts: Wirkmechanismus eines isoQC-Inhibitors. Ohne Zyklisierung durch die isoQC kommt es zum Abbau durch unspezifische Aminopeptidasen und dadurch zur Bindung als Antagonist an CCR2.

### 2.3.3 Inhibition der Glutaminylzyklasen

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass im Modelltier Kaninchen die CCL2-Expression bei atherosklerotischen, sowie mit Ballonangioplastie behandelten Individuen stark erhöht ist (MORI et al. 2002). Auch beim Menschen korreliert eine langanhaltende, unphysiologische CCL2-Konzentration nach dem PTA-Eingriff mit der Restenosewahrscheinlichkeit (CIPOLLONE et al. 2001). CCL2 ist daher ein vielversprechendes Zielprotein der Wirkstoffforschung (CYNIS 2009). Da eine N-terminale Verkürzung des Proteins dessen Funktion beeinträchtigt (HEMMERICH et al. 1999) und das Enzym isoQC für die Stabilisierung von CCL2 sorgt, sollte im durchgeführten Versuch die Potenz eines unspezifischen QC/isoQC-Inhibitors durch orale Applikation im atherosklerotischen Kaninchenmodell getestet werden. In der Literatur ist die enterale Behandlung gegen das Auftreten einer verstärkt ausgebildeten ISR durch einen selektiven CCL2-Inhibitor bereits als erfolgreich beschrieben worden (IALENTI et al. 2011). Auch die orale Anwendung der entwickelten QC/isoQC-Inhibitoren soll perspektivisch die Folgen, die durch CCL2-Überstimulation im versorgten Gefäßsegment post-operativ entstehen, verringern und so den langfristigen Erfolg einer derartigen Intervention sicherstellen.

### 2.3.4 Inhibition durch MWT-S-17 und MWT-S-18

MWT-S-17 ist ein publizierter (BUCHHOLZ 2007, RUIZ-CARRILLO et al. 2011), nicht selektiver QC/isoQC-Inhibitor, der (wie auch MWT-S-18) von der Arbeitsgruppe Wirkstoffdesign und Analytische Chemie des Fraunhofers IZI-MWT selbst synthetisiert wurde (vergleiche Tbl. 12). Die Hemmung erfolgt kompetitiv, der Inhibitor konkurriert also mit dem Substrat (hier das unreife, nicht zyklisierte CCL2) um das aktive Zentrum des Zielenzyms. Charakteristisch ist, dass die Hemmung durch eine ausreichend hohe Substratkonzentration überwunden wird (BERG et al. 2014).

Die Potenz eines Inhibitors kann unter anderem durch den  $K_i$ -Wert beschrieben werden.

Der  $K_i$ -Wert ist die Dissoziationskonstante für den Enzym-Inhibitor-Komplex. Sie gibt die Inhibitorkonzentration an, die eine Halbierung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit bewirkt (KRIEGEL et al. 2014). Je kleiner der  $K_i$ -Wert ist, desto stärker ist die Enzymhemmung (KÜBLER et al. 1975).

## 2.4 Tiermodelle

### 2.4.1 Anforderungen an das Tiermodell

Da die Wirksamkeit des verwendeten Inhibitors MWT-S-17 bereits *in vivo* im atherosklerotischen Mausmodell getestet wurde (CYNIS et al. 2011), ging es im Folgeprojekt um ein realistisches und gut extrapolierbares Modelltier für die Therapie der ISR. Um originale Medizinprodukte aus der Humanmedizin verwenden zu können, sollte zu diesem Zweck ein Großtiermodell etabliert werden.

KAPOURCHALI et al. verglichen 2014 die wichtigsten Restenose-Tiermodelle miteinander. Neben den beiden konventionellen Nagerspezies wurden auch Kaninchen und Schweine diskutiert, die sich für diese Fragestellung eignen. Da beim Menschen die Stentimplantation ausschließlich in pathologisch veränderten Gefäßen und folglich bei hohen Serumcholesterinwerten stattfindet, sollte für diesen Versuch außerdem ein atherosklerotisches Tiermodell verwendet werden.

### 2.4.2 Schweinemodell

Laut IQBAL et al. (2016) dient das Schweinemodell als Goldstandard für die Evaluierung der Produktsicherheit von Stents. Aufgrund der anatomischen Nähe zum Menschen und der praktikablen Größe werden für die Durchführung der PTA häufig die Koronararterien verwendet. Allerdings sind nach VAN ANDEL et al. (2003) Schweinearterien bis zu drei Mal elastischer als die des Menschen, was eine große Rolle bei der Aufdehnung des zu behandelnden Gefäßes durch einen Ballonkatheter spielen kann.

Bei dem hier durchgeführten Versuch sprachen zudem praktische Erwägungsgründe gegen das Schweinemodell, da es im Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie keine Möglichkeit gibt, Schweine unter standardisierten Bedingungen zu halten.



### 2.4.3 Kaninchenmodell

Logistische Überlegungen bezüglich der Haltungsmöglichkeiten, sowie der Wunsch die interventionelle Versorgung möglichst nahe an die humane Situation anzulehnen, ließen die Entscheidung auf das Kaninchenmodell fallen. Laut KHANNA et al. (2013) weisen die Iliakalgefäße eine den humanen Koronararterien vergleichbare Morphologie auf. Diese Analogie lässt das Kaninchen für den experimentellen Stenteinsatz in diesen Gefäßen als Modell optimal erscheinen. Man kann drei für dieses Forschungsgebiet relevante Stämme unterscheiden, für die vorwiegend die englische Nomenklatur verwendet wird:

„New Zealand White Rabbit“ (NZW): NZW werden schon seit 1926 als Modelltier in der Atheroskleroseforschung eingesetzt (CLARKSON et al. 1926). Sie erkranken zwar nicht spontan, sind aber empfindlich gegenüber cholesterin- und fetthaltiger Nahrung, die sie im hohen Maße gastrointestinal resorbieren. Durch Fütterung einer Spezialdiät wird die LDL-Konzentration im Blut erhöht. Diese kann unterschiedliche Cholesteringehalte haben und enthält zusätzlich Pflanzenfett, um die Aufnahme des Cholesterins aus dem Gastrointestinaltrakt zu fördern. Das alimentär aufgenommene LDL oxidiert leicht und wird ungehemmt und konzentrationsunabhängig von Makrophagen aufgenommen, die dann in den geschädigten Endothelzellen zu Schaumzellen konvertieren. Diese stellen einen ausschlaggebenden Pathogenesefaktor dar (KAPOURCHALI et al. 2014).

SCHWARTZ et al. (2004) stellten fest, dass in der Literatur für NZW als Restenosemodelle Blutgesamtcholesterinwerte über 1000 mg/dl als Richtwert für die Atheroskleroseinduktion angenommen wurde. Nach GRUNDGEIGER (2008) ist dieser Wert nach drei Wochen einer 1 % oder zehn Wochen einer 0,5 % Cholesterindiät erreicht. Zusätzlich wird in vielen Versuchen eine Arteriosklerose durch eine Ballondilatation induziert (RIBICHINI et al. 2007, PHINIKARIDOU et al. 2009).

Die Kritik an der alimentär induzierten Atherosklerose im NZW besteht darin, dass histopathologisch eine signifikant höhere Schaumzellanzahl zu beobachten ist, als in der Neointima der menschlichen Arterie (CULLEN et al. 2003, IQBAL et al. 2016). Für den geplanten Versuch eignet sich dieses Tiermodell gerade deshalb sehr gut, da der medikamentöse Einfluss auf die Monozytenanlockung durch QC/isoQC Hemmung untersucht werden soll.

Aufgrund der beschriebenen Charakteristika eignen sich die NZW in besonderem Maße für den geplanten Versuchsaufbau, weshalb dieser Stamm für den vorliegenden Versuch gewählt wurde.

„Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit“ (WHHL): Diese Linie entstand durch die Inzucht mit einem Tier, welches eine Spontanmutation in einem einzigen Gen aufwies. Diese wird rezessiv vererbt (HANSEN et al. 1994). Bei homozygoten Tieren fehlt der LDL-Rezeptor auf den Zellmembranen, wodurch sie als Modell für die familiäre Hypercholesterinämie des Menschen dienen (SCHWANDT et al. 2007). Durch diese homozygote Mutation kann LDL nicht an seinen Rezeptor binden und es kommt zur Verzehnfachung der Serumcholesterinwerte. Ab dem dritten Lebensmonat treten spontane Atherosklerosen in Aorta und Koronararterien auf (WATANABE et al. 1983). Da die Pathogenese der Hyperlipidämie durch einen Rezeptordefekt zustande kommt, erscheint dieses Modell im Sinne der translationalen Forschung weniger geeignet als die Atheroskleroseinduktion durch cholesterinhaltiges Futter.

„St. Thomas Hospital Rabbit“ (STH): Durch Zuchtselektion veränderte Linie, bei der auch mit Fütterung von Standardfutter die Ausbildung einer Hypertriglyceridämie im Vordergrund steht, die sekundär mit einer Hypercholesterinämie verknüpft sein kann (BEATY et al. 1992). Durch Überproduktion weisen Individuen dieser Linie unter anderem erhöhte LDL-Plasmalevel auf und entwickeln dem Menschen ähnliche atherosklerotische Läsionen (NORDESTGAARD et al. 1991).

## 2.5 Ziele der Arbeit

Die Ursache der Restenose in durch Stentimplantationen behandelten atherosklerotischen Gefäßen ist noch nicht vollständig verstanden. Verschiedene Autoren (CYNIS 2009, RUITER et al. 2015) weisen auf eine immunologische Komponente hin, bei der die Monozyteninvasion eine tragende Rolle spielt. Anknüpfend an diese postulierte Ätiologie sollte mit dieser Arbeit die Frage beantwortet werden, ob es durch eine systemische Beeinflussung der Monozyteninvasion mittels oraler Gabe eines QC/isoQC-Inhibitors nach BMS Implantation, zu einer reduzierten Neointimabildung und damit zu einer minimierten ISR kommt.

Daraus ergaben sich konkret folgende Ziele:

- Die Charakterisierung zweier potentieller Inhibitoren der isoQC und der Vergleich ihrer Bioverfügbarkeit im Kaninchen.
- Die Etablierung eines in der Literatur beschriebenen ISR Models im atherosklerotischen Kaninchen.
- Der daran anschließende Behandlungsversuch mit einem ausgewählten QC/isoQC-Inhibitor und die Untersuchung des Behandlungseffektes.

## **3 MATERIAL, TIERE & METHODEN**

### **3.1 Materialien**

Alle verwendeten Materialien befinden sich im Anhang unter 9.1.

### **3.2 Tiere**

#### **3.2.1 Versuchstiere**

Alle an den Versuchstieren vorgenommenen Eingriffe und Behandlungen wurden durch das ausschließlich zu diesem Versuchszweck beantragte Tierversuchsvorhaben DD24-5131/276/45 von der Landesdirektion Sachsen (Leipzig) am 23.12.2014 genehmigt. Für den Versuch wurden weibliche, 16 Wochen alte Kaninchen der Rasse Weißer Neuseeländer (NZW) des Versuchstierzüchters Charles River verwendet.

#### **3.2.2 Fütterung**

Während der 14 täglichen Eingewöhnungszeit erhielten die Tiere Standard-Kaninchenfutter von ssniff (sniff K-H), portioniertes Heu und autoklaviertes Leitungswasser *ad libitum*. Während der ersten vier Versuchswochen wurde das Futter gegen Pellets mit erhöhten Energie- und Fettgehalt (ssniff SM K „High Fat and Cholesterol“ mit 4,9 % Kokosnussfett und 1 % Cholesterin) ausgetauscht, um eine Hypercholesterinämie zu induzieren. In den letzten beiden Versuchswochen wurden die Tiere wieder auf Standardfutter umgestellt.

#### **3.2.3 Haltungsbedingungen**

Die Kaninchen der Pharmakokinetikstudie (PK) wurden, abgesehen von den Blutentnahmen (2 x für 24 h), in Gruppen von jeweils zwei harmonisierten Tieren gehalten. Die Tiere des Behandlungsversuches wurden einzeln gehalten. Pro Tier stand ein Einzelkäfig Typ Europa mit der Grundfläche von 4200 cm<sup>2</sup> zur Verfügung, der ein erhöhtes Podest aufwies. Als „Enrichment“ dienten Nagehölzer, die ins Frontgitter eingeklemmt wurden. Die Temperatur

betrug 18 °C - 19 °C, die Luftfeuchtigkeit 50 – 60 % und die Luftwechselrate 12 – 15 n/h. Es fand alle 12 h ein Hell-Dunkel-Wechsel statt. Die Raumausleuchtung betrug ca. 250 Lux. Die Tiere wurden vor allem in den ersten beiden Versuchswochen regelmäßig durch Berührungen und Fixation auf dem Arm und im Untersuchungsbeutel an die später folgende Manipulation gewöhnt. Im Behandlungsversuch wurde ab der zweiten Woche erst Trinkwasser, später das Vehikel mittels 20 ml Spritze oral eingegeben, um durch die Gewöhnung an diese Maßnahmen den Stress im Laufe des Versuches zu reduzieren.

### **3.2.4 Hygienemanagement**

Laut Hygieneempfehlungen der „Federation of European Laboratory Animal Science Associations“ (FELASA 2014) sollen verschiedene Erreger alle drei Monate, andere jährlich getestet werden. Die Tierbestände von Charles River sind laut Gesundheitszeugnis frei von diesen Erregern. Nach dem Behandlungsversuch wurden insgesamt fünf Tiere im Pathologischen Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät pathologisch-anatomisch und histologisch untersucht. Die entnommenen Organproben wurden an die Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen geschickt. Die Proben wurden dort auf entsprechende, von der FELASA als relevant klassifizierte Mikroorganismen untersucht. Keiner der Erreger wurde nachgewiesen.

### **3.2.5 Aufbau der Tierversuche**

Es wurden zwei Tierversuche durchgeführt:

1. Vorversuch/ Pharmakokinetikstudie: Der erste Versuch mit 12 Tieren diente der pharmakologischen Charakterisierung von zwei Glutaminylzyklaseinhibitoren *in vivo*: MWT-S-17 und MWT-S-18. Nach der Gabe der jeweiligen Substanz wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Blutproben entnommen und mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographiegekoppelter Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert. Anschließend wurde an den Tieren die Operationsmethode etabliert.

2. Hauptversuch/Behandlungsversuch: 28 Tieren wurden nach zwei Wochen hochkalorischer Diät bilateral Stents in die *Aa. iliacaе externaе* implantiert. Anschließend wurden sie randomisiert in verschiedene Gruppen eingeteilt und vier Wochen lang entsprechend ihrer Grup-

penzugehörigkeit behandelt. Zwei Wochen vor dem Versuchsende fand eine erneute Umstellung auf Standardfutter statt.

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Herstellung der Kaninchen-QC *in vitro*

Um die inhibitorische Potenz der QC/isoQC-Inhibitoren für die Kaninchen-Glutaminylylzyklase (rQC) zu bestimmen, wurden die Inhibitorkonstanten ( $K_i$ ) von MWT-S-17 und MWT-S-18 mit dem *in vitro* hergestellten Kaninchenenzym gemessen. Bei den beschriebenen Versuchen handelt es sich um Experimente nach dem Gentechnikgesetz, die seit dem 12.02.2014 in der S1-Anlage mit dem Aktenzeichen 402.0.1 66230-4603 vom Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt (Halle) zugelassen wurden.

##### 3.3.1.1 Genamplifikation und Restriktion

Zur Klonierung wurde das Plasmid mit dem Gen der rQC, sowie die entsprechenden Primer generiert und bestellt. Die Amplifizierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) fand mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Protokoll (Thermo Fisher Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase) statt.

Der 50 µl PCR-Ansatz (bestehend aus 2,5 µl Primer, 0,5 µl Ziel-DNA, 1 µl dNTPs (10 mM), 10 µl Phusion Buffer (5x), 33 µl ddH<sub>2</sub>O und je 0,5 µl Phusion DNA Polymerase (2 U/ml)) wurde mit dem in Tabelle 1 gezeigten PCR-Programm inkubiert.

**Tbl. 1:** PCR-Programm zur Amplifikation der Ziel-DNA für die Transformation.

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1
Denaturierung	98 °C	30 s	30
Primer-Bindung	65 °C	30 s	30
Elongation	72 °C	30 s	30
Finale Elongation	72 °C	30 s	1
Inkubation	4 °C	∞	1

Die PCR-Produkte wurden mittels Promega Wizard-Kit gereinigt und in 30 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Anschließend erfolgte die Restriktion des Plasmids sowie des Expressionsvektors pPICZα A mit den Enzymen Xho I und Not I HF. pPICZα A ist ein „Shuttle-Vektor“, der häufig für die Manipulation in Hefen (*P. pastoris*) verwendet wird. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C wurden beide Ansätze bei 65 °C für 30 min hitzeinaktiviert. Anschließend fand eine erneute DNA-Aufreinigung sowie Elution in Wasser statt. Die DNA-Konzentration wurde mittels Spektralphotometer bestimmt und die Proben bei -20 °C gelagert.

### **3.3.1.2 Ligation von rQC mit pPICZα A und Transformation in *E. coli* DH5α**

Der Ligationsansatz wurde im Verhältnis 1:3 (Vektor:Insert) gewählt und mit dem Enzym T4 DNA Ligase 3 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die durch den Verdau produzierten überhängenden Enden („sticky ends“) von Vektor und Ziel-DNA hybridisieren miteinander. Durch die enzymatische Aktivität der DNA-Ligase werden die Einzelstränge kovalent verbunden. Anschließend wurde der Ligationsansatz in den *E. coli*-Stamm DH5α transformiert, indem DNA und Zellen auf Eis zusammengebracht wurden. Nach 30 min Inkubation, in der die kompetenten Zellen die DNA aufnehmen, folgte eine Hitzeschockinaktivierung (42 °C; 60 s). Anschließend wurden die transformierten Bakterien in 250 µl 37 °C warmes LB Medium gebracht und für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Jeweils 20 und 200 µl Material wurden auf zeocinhaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. An 5 Kolonien wurde zur Überprüfung des Transformationserfolges eine Kolonie-PCR durchgeführt.

Für die Agarose-Gelelektrophoresen wurden 100 ng der DNA mit 2 µl Loading Dye Purple (6x) versetzt und als Größenstandard der Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 20 min bei 120 V.

Bei 2 Klonen wurde das gewünschte Insert mit einer Größe von ca. 1 kb festgestellt. Diese Klone wurden über Nacht in 5 ml Flüssigkultur mit LB-Medium und Zeocin bei 37 °C kultiviert. Nachdem der Überstand aliquotiert und mehrmals zentrifugiert wurde, fand die DNA-Gewinnung aus dem Zellpellet durch eine Plasmidpräparation (Thermo Fisher Scientific Gene Jet Plasmid Miniprep Kit) nach Protokoll statt. 2 µl der so gewonnenen DNA wurden analytisch verdaut (Ansatz wie beim präparativen Doppelverdau), um das rQC-Gen aus dem Vek-

tor zu schneiden. Die nachfolgende Agarose-Gelelektrophorese, bei der sowohl die Bande des Vektors pPICZ $\alpha$  A bei ca. 3.600 bp sowie das Gen der rQC bei ungefähr 1.000 bp nachgewiesen werden konnten, diente als Kontrolle für die Insertion des Zielgens in den Vektor. Jeweils 100 ng der DNA beider Klone, die eine Insertion der rQC zeigten, wurden zum Sequenzieren zu eurofins Genomics geschickt.

Nach der Validierung der korrekten Gensequenz durch Sequenzierung der Plasmide wurde ein entsprechender Klon mit Insert ausgewählt und eine Übernachtskultur in 50 ml zeocinhaltigem LB-Medium angesetzt. Nach Plasmidpräparation bei mehreren Proben wurde die DNA-Konzentration mittels Spektralphotometer bestimmt.

Der Expressionsvektor pPICZ $\alpha$  A wurde durch Restriktion mit Pme I linearisiert (4 Ansätze: 30  $\mu$ l Plasmid-DNA, 4  $\mu$ l Cut-Smart Puffer, 3  $\mu$ l Pme I ad ddH<sub>2</sub>O; Inkubation bei 37 °C für 4 h), die gewonnene DNA mit 500  $\mu$ l Isopropanol gefällt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Nach 1 h Zentrifugation bei 4 °C (13.000 x g) wurde der Überstand abgenommen und das DNA-Pellet luftgetrocknet. Nach der Aufnahme der DNA in 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (62 °C) wurde erneut die Konzentration bestimmt und die Transformation in Hefe vorbereitet.

### **3.3.1.3 Transformation in *P. pastoris* X33 und Testexpression**

Zur Expression des rQC-Proteins wurde *P. pastoris* (Stamm: X33) ausgewählt. Die Proteinexpression erfolgt nach Induktion des AOX-1 Promotors mit Methanol und die Selektion positiver Transformanten wurde über das Antibiotikum Zeocin gewährleistet. Die Transformation in kompetente *P. pastoris* X33 wurde durch Elektroporation nach vorgegebenem Protokoll (2.000 - 2.500 V für 5 ms) durchgeführt. Die präparierten Plasmide wurden so in zwei unterschiedlichen Mengen (800 ng und 100 ng) in die Hefezellen eingebracht und anschließend für 2 h bei 30 °C unter regelmäßiger Durchmischung inkubiert. Anschließend wurden jeweils 200  $\mu$ l, 100  $\mu$ l sowie nach Zentrifugation (9.000 x g) das in ca. 100  $\mu$ l Medium resuspendierte Zellpellet auf YPDS und Zeocin-haltige Platten aufgetragen, die 48 h lang bei 30 °C inkubiert wurden. Dabei wiesen beide Gruppen die gleichen Wachstumsraten auf und wurden analog weiter verwendet.

Nach Umsiedlung von 96 ausgewählten Klonen auf eine zeocinhaltige YPDS Platte und weiteren 48 h Inkubation bei 30 °C, wurden mit einer Pipettenspitze Zellen entnommen und



in 2 ml BMGY Medium für 24 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 4 °C (2.000 x g) wurde der Überstand verworfen und 2 ml BMMY Medium hinzugeben. Nach Resuspension und weiteren 24 h bei 30 °C unter Schütteln wurden am dritten und vierten Tag jeweils 10 µl Methanol (abs.) zugegeben. Am fünften Tag, nach 96 h, wurden die Proben bei 4 °C für 10 min (2.000 x g) zentrifugiert und der Überstand für die Aktivitätsmessungen abgenommen.

### **3.3.1.4 Fluorometrische Aktivitätsmessung**

Die Bestimmung der rQC-Aktivität in den generierten Überständen der Hefeexpression erfolgte mittels gekoppelten optischen Tests. Bei diesem Test kommt N-Glutaminyl-beta-Naphthylamin (Gln-βNA), ein artifizielles Substrat der QC, und das Hilfsenzym Pyroglutamyl-Aminopetidase (pGAP) zum Einsatz. Wurde die QC in ausreichendem Maße exprimiert, wird aufgrund der Enzymaktivität Gln-βNA zu Pyroglutamyl-β-Naphtylamin (pGlu-βNA) zyklisiert. Durch die pGAP wird die Abspaltung des Pyroglutamat Restes katalysiert und β-Naphtylamin (β-NA) als Fluorophor freigesetzt. Dieses wird bei einer Wellenlänge von 340 nm angeregt und die Fluoreszenz kann bei einer Wellenlänge von 410 nm detektiert werden. Die gemessene Aktivität wird in relativer Fluoreszenzeinheit pro Minute (RFU/min) angegeben. Je größer dieser Wert, desto höher die QC-Aktivität im Medium. Kann keine Fluoreszenz nachgewiesen werden, ist das Enzym nicht aktiv bzw. wurde nicht exprimiert. Alle Reaktionen fanden in dem Puffer 50 mM TRIS (pH 8,0) statt. Das Gesamtvolumen des Messansatzes betrug 250 µl. Es wurden 20 µl einer Gln-βNA-Lösung (3,8 g Gln-βNA in 50 ml TRIS) mit 25 µl pGAP (1,3 mg/ml) bei 30 °C 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 25 µl Probe pro Enzymlösung gestartet und für mindestens 10 min mittels Messprogramm verfolgt. Dabei ergaben sich keine Unterschiede in der Aktivität zwischen den Klonen mit unterschiedlichen DNA-Mengen bei der Elektroporation.

Anschließend wurde ein zweiter Test durchgeführt um auszuschließen, dass die gemessene Aktivität durch im Medium befindliche, unspezifische Aminopeptidasen hervorgerufen wird. Dafür wurde die Messung wie folgt bei 6 Proben exemplarisch durchgeführt: 200 µl einer Gln-βNA-Lösung wurden mit 25 µl Puffer bei 30 °C für 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 25 µl Probe pro Enzymlösung gestartet. Es wurde keine Aktivität festgestellt.

Die drei Proben, mit der höchsten QC-Aktivität wurden auf einer frischen YPDS Platte fraktioniert ausgestrichen und weitere 2 d bei 30 °C inkubiert.

### **3.3.1.5 Klonkonservierung und Fermentation**

Um die Klone mit der höchsten QC-Aktivität zu konservieren, wurde eine Übernachtskultur bei 30 °C mit 10 ml YPD und 10 µl/10 ml Zeocin sowie den entsprechenden Hefezellklonen angelegt. Diese wurde mit 25 % Glycerin vermischt und bei -20 °C gelagert.

Für die Expression der rQC im Fermenter wurde das Fermentationsmedium hergestellt, der Fermenter befüllt und vollständig zusammengebaut autoklaviert. Zeitgleich wurde eine Vorkultur des aktivsten Klons über Nacht mit 200 ml BMGY-Medium angesetzt und bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nachdem die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) der Übernachtskultur bei 3,8 lag (optimale Zelldichte für die Fermentation  $OD_{600} = 2 - 4$ ) wurde die Fermentation gestartet. Diese fand bei 30 °C, konstantem pH-Wert von 5,5 (reguliert durch automatische Ammoniak-Zugabe) und einer  $O_2$ -Konzentration von mindestens 20 % statt.

Die Kalibrierung des Computerprogramms erfolgte nach Betriebsanweisung. Die erste Phase („Glycerol-Batch“) zeichnet sich durch die Verstoffwechselung des Glycerins im Medium aus, wodurch sich die Hefezellen vermehren können. Ist dieses aufgebraucht wird automatisch Glycerin zugefüttert („Glycerol-Fed-Batch“). Anschließend wird Methanol zugegeben („Methanol-Fed-Batch“), wodurch die Expression des Zielproteins durch den AOX-1 Promotor induziert wird. Über den gesamten Fermentationsprozess wurden der Kultur zweimal täglich 10 ml Probenmaterial entnommen um die QC-Aktivität zu überprüfen. Das Medium wurde für 10 min zentrifugiert ( $13.000 \times g$ ), der Überstand abgenommen und bei -20 °C gelagert.

Nach 70,5 h wurde die Fermentation beendet, das Fermentationsmedium entnommen und bei 4 °C für 20 min ( $7.000 \times g$ ) zentrifugiert. Der pH-Wert des Überstandes (1,9 l) wurde auf 6,8 eingestellt und anschließend bei -20 °C gelagert.

Anschließend wurde die Aktivitätsmessung aller Proben im Doppelansatz mit Negativkontrolle nach oben beschriebenem Protokoll durchgeführt. Es konnte ein Aktivitätsanstieg im Zeitverlauf der Fermentation nachgewiesen werden.

### 3.3.1.6 Aufkonzentrierung und $K_i$ -Wert Bestimmung

Aus dem aufgetauten, durch die Fermentation gewonnenen Überstand wurden ca. 500 ml entnommen und bei 4 °C für 60 min zentrifugiert (7.000 x g). Der Überstand wurde abgegossen und mit insgesamt 120 ml Puffer zur Proteinaufkonzentrierung gemischt. Davon wurden 50 ml mittels Rührzelle bei 10 °C und 3 bar durch Filtration einer Membran mit einer Ausschlussgrenze („cut off“) von 10 kDa aufkonzentriert. Die Rührzelle wurde mehrmals täglich wieder aufgefüllt, bis das Endvolumen ca. 25 ml betrug. Das Endprodukt wurde im Verhältnis 1:1 mit 100 % Glycerin versetzt und bei -20 °C gelagert. Während des Aufkonzentrierungsprozesses wurden die Proben vom Durchlauf, sowie dem einzuengenden Fermentationsprodukt entnommen, um die kontinuierliche Aktivität der rQC sicherzustellen.

Die  $K_i$ -Wert Bestimmung für die Inhibitoren MWT-S-17 und MWT-S-18 mittels aufkonzentriertem Fermentationsüberstandes fand mithilfe eines gekoppelten optischen Testes statt. Als Substrat diente Glutaminyl-7-Amino-4-Methylcumarin. Um die optimalen Inhibitorkonzentrationen für die  $K_i$ -Wert-Bestimmung zu ermitteln, wurde bei mehreren Substrat- und Inhibitorkonzentrationen die inhibitorische Aktivität bestimmt. Lag die Restaktivität bei einer Messung bei ca 20 %, konnten davon die sechs Inhibitorkonzentrationen für die  $K_i$ -Wert Bestimmung abgeleitet werden (3125 nM, 1562,5 nM, 780 nM, 390 nM, 195 nM, 97,66 nM). Das Gesamtvolumen des Messansatzes betrug 250  $\mu$ l. Für die Messungen wurden als Puffer sowie zum Verdünnen der Ansätze 50 mM TRIS-Puffer (pH 8,0), 100  $\mu$ l Substrat in vier verschiedenen Konzentrationen (250  $\mu$ M, 125  $\mu$ M, 62,5  $\mu$ M, 3,125  $\mu$ M), 100  $\mu$ l Inhibitor in sechs verschiedenen Konzentrationen (siehe oben) und 25  $\mu$ l pGAP (1,3 mg/ml) gemischt und für 10 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Messung durch Zugabe von 25  $\mu$ l QC-Lösung gestartet und die Zeit-Umsatz-Kurven für mindestens 10 min aufgenommen. Die  $K_i$ -Wert Bestimmungen wurden dreimal unabhängig voneinander mit frisch gelöster Inhibitorstammlösung durchgeführt und mit der Software GraFit (Version 7) ausgewertet.

### **3.3.2 Charakterisierung von MWT-S-17 und MWT-S-18 *in vitro***

#### **3.3.2.1 Löslichkeits- und Stabilitätsuntersuchungen der Inhibitoren**

Die Löslichkeitsgrenze des Inhibitors in unterschiedlich konzentrierter Dimethylsulfoxid (DMSO) Lösung wurde mit Hilfe eines Nephelometers bestimmt. Das Testprinzip beruht auf der Ablenkung und Messung von Streustrahlung, die bei Lichteinfall von Partikeln in einer Suspension entsteht. Der Zusammenhang von Partikelkonzentration und Streulichtintensität ist linear, sodass bei der Messung von unterschiedlichen Konzentrationen einer Lösung genau bestimmt werden kann, ab wann diese vollständig gelöst vorliegt.

Dazu wurde eine Stammlösung generiert, die in elf weiteren Proben seriell 1:1 verdünnt wurde. Pro Konzentration fand eine Sechsfachbestimmung statt. Bei einer Ausgangskonzentration von 30 mg MWT-S-17 pro ml PBS mit 10 % DMSO lag der Löslichkeitswert bei 10,33 mg/ml. Durch den Zusatz von 5 % Polysorbat 80 (Tween 80) konnte die Löslichkeit erhöht werden und betrug bis zu 14,75 mg/ml. Der Ansatz wurde 24 h inkubiert und erneut gemessen. Es ergab sich eine reduzierte Löslichkeit von 6,3 mg/ml. Für MWT-S-18 betrug die Löslichkeit in DTP-10 3,15 mg/ml. Nach 70 h Inkubation wurde erneut gemessen. Die Löslichkeit betrug 1,87 mg/ml. Die höchste Löslichkeit eines auf Dauer verträglichen Vehikels wurde mit DTP-10 erreicht, was aus 10 % DMSO als Lösungsmittel und 5 % Polysorbat 80 in PBS bestand.

#### **3.3.2.2 Herstellung einer Suspension mit Hydroxypropylmethylcellulose**

Nach Auswertung der PK stand fest, dass DTP-10 nicht als Vehikel für die benötigte Konzentration im Behandlungsversuch zur Verfügung stehen konnte (vergleiche 4.2.2). Deshalb sollte der Inhibitor für die *p.o.* Applikation in eine Suspension überführt werden. Um die optimale Viskosität zu bestimmen, wurden jeweils 1 %, 2 %, 5 % und 10 % Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) in Wasser gelöst und für 120 min quellen gelassen. Anschließend wurden 3 g Inhibitor mit 10 ml pro HPMC-Suspension in einer Fantaschale vermischt (was der Menge für ein 3 kg schweres Kaninchen der hoch dosierten Gruppe entsprach). Die Viskosität des Vehikels inklusive Inhibitors war mit 1 % iger HPMC-Suspension am besten für eine Applikation geeignet.

### **3.3.2.3 Bestimmung der Zytotoxizität der Inhibitoren**

Die Toxizität der Inhibitoren wurde mit dem Homogeneous Membrane Integrity Assay in zwei verschiedenen humanen Zelllinien untersucht. Diese wurden routinemäßig mittels PCR auf Mycoplasmen getestet.

Das Prinzip des Tests beruht auf der Messung des durch Zelllyse induzierten Austrittes des zytoplasmatischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH), welches in Säugerzellen den Umsatz von Laktat zu Pyruvat katalysiert. Im Assay wird Laktat unter Oxidation von Nicotinadenindinukleotid (NAD) durch die freigesetzte LDH in Pyruvat umgewandelt, wodurch NADH entsteht. Dadurch wird die Reduktion vom blauen Redoxindikator Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin katalysiert, was photometrisch bestimmt werden kann (siehe Abb. 2).

#### **3.3.2.3.1 Kultivierung von Hep-G2 Zellen**

Die 5. Zellpassage der humanen hepatozellulären Karzinomzelllinie Hep-G2 mit der Konzentration  $3 \times 10^6$  Zellen/ml wurde aufgetaut und in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 15 ml RPMI Medium und 10 % fetalem Kälberserum (FBS) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Der Assay wurde mehrfach und für jede Inhibitor-Charge erneut mit unterschiedlichen Passagen (14, 16, 18) durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung sowie die routinemäßige Viabilitätssmessungen fanden bei beiden Zelllinien mittels Impedanzmessung statt.

#### **3.3.2.3.2 Kultivierung von SH-SY5Y Zellen**

Die humanen Neuroblastomzellen der Linie SH-SY5Y befanden sich mit einer Zellkonzentration zwischen  $2 \times 10^6$  und  $3 \times 10^6$  Zellen/ml bereits in Kultur. Sie wurden in 15 ml DMEM inklusive 10 % FBS bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Um die Inhibitoren auf Toxizität bzw. Viabilität zu testen, wurden Zellen der Passage 17, 19 und 21 verwendet.

### **3.3.2.4 Toxizitätssassay**

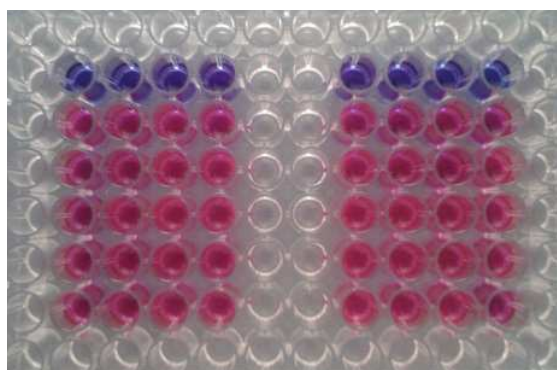
In eine 96-„well“-Platte wurden jeweils 40 „wells“ (Doppelbestimmung) mit 100 µl  $3 \times 10^4$  Zellen/ml SH-SY5Y sowie 100 µl  $5 \times 10^4$  Zellen/ml Hep-G2 eingesät und für 24 h inkubiert.

Beide Inhibitoren, MWT-S-17 und MWT-S-18, wurden in vier unterschiedlichen Konzentrationen (100 µM, 10 µM, 1 µM und 0,1 µM) in DMSO gelöst, mit Medium verdünnt und nach Überprüfung der Zellviabilität und -dichte aufgetragen. Zusätzlich wurden eine Reihe mit unbehandelten Zellen (Positivkontrolle) und eine Reihe ohne Zellen mit FBS-freiem Medium (Negativkontrolle) angelegt, um eine Fluoreszenz durch die möglicherweise im tierischen Serum enthaltende LDH auszuschließen. Es fand eine Vierfachbestimmung statt. Die äußeren „wells“ wurden als Schutz vor Verdunstung mit 100 µl serumhaltigem Medium belegt.

Nach weiteren 24 h im Inkubator wurden die eingesäten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 50 µl einer 1:50 in PBS verdünnten 9 % Triton-X-100 (w/v) Lösung lysiert. Nach 10 min Inkubation auf dem Schüttler, wurde allen Proben 50 µl des Substrat-Puffergemisches zugeführt und 30 s geschüttelt. Anschließend wurden die SY5Y-Zellen 20 min, die Hep-G2-Zellen 10 min im Dunkeln inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion konnte der jeweilige Farbumschlag per Fluoreszenzmessung quantifiziert werden. Dabei betrug die Anregungswellenlänge 544 nm, die Emissionswellenlänge 595 nm. Die Berechnung der Zellviabilität erfolgte mit Formel (I).

(I)

$$Viabilität \% = 100 \times \frac{\text{Experimenteller Wert} - \text{Hintergrundfluoreszenz Medium}}{\text{Maximale LDH Ausschüttung} - \text{Hintergrundfluoreszenz Medium}}$$



**Abb. 2: Reduktion von Resazurin (blau) zum Resorufin (pink) im Zytotoxizitätsassay.** Nach induzierter Zellyse katalysiert LDH unter Oxidation von NAD den Umsatz von Laktat zu Pyruvat, wodurch NADH entsteht. Dadurch wird die Reduktion vom Redoxindikator Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin katalysiert. Bei zum Zeitpunkt des Assays toten Zellen (z.B. durch zytotoxische Effekte der zu testenden Substanz) findet dieser Prozess nicht statt. Das Medium bleibt, wie hier in der zellfreien Negativkontrolle, blau.

### **3.3.3 Tierversuch *in vivo***

#### **3.3.3.1 Gruppeneinteilung**

Pharmakokinetikversuch: Nach einer Akklimatisierungszeit von 14 Tagen wurden die Kaninchen randomisiert vier Gruppen mit jeweils drei Tieren zugeteilt:

1. MWT-S-17 *p.o.*: 10 mg/kg
2. MWT-S-17 *i.v.*: 3 mg/kg
3. MWT-S-18 *p.o.*: 10 mg/kg
4. MWT-S-18 *i.v.*: 3 mg/kg

Behandlungsversuch:

Nach der Operation wurde den Tieren eine der vier Gruppen mit folgender Tagesdosis zuge-  
lost:

1. Behandlungsgruppe: MWT-S-17 hohe Dosis, 1 g/kg
2. Behandlungsgruppe: MWT-S-17 niedrige Dosis, 330 mg/kg
3. Positivkontrolle: Behandlung Prednison, 2,1 mg/kg
4. Negativkontrolle: Behandlung Vehikel

#### **3.3.3.2 Pharmakokinetikstudie**

Versuchsaufbau: MWT-S-17 und MWT-S-18 wurden insgesamt 12 Tieren verabreicht. Dazu wurde der entsprechende Inhibitor in zwei Versuchsgruppen mit je drei Tieren oral bzw. intravenös verabreicht. Als Vehikel wurde, aufgrund der Ergebnisse der Löslichkeitsstudien, DTP-10 verwendet, was sich aus 10 % DMSO und 5 % Tween 80 in PBS zusammensetzte. Der entsprechende pulverförmig vorliegende Inhibitor wurde abgewogen und 30 mg/ml in DMSO gelöst, sodass die Inhibitorkonzentration im Vehikel 3 mg/ml betrug. Die Lösungen wurden unmittelbar vor der Gabe frisch hergestellt und das benötigte Volumen der Applikationslösung tierindividuell errechnet.

Versuchsende war die Operation der Tiere wie unter 3.3.3.6 beschrieben, um die OP-Methode sowie die Probenentnahme und Aufbereitung zu etablieren und zu standardisieren. Dabei wurde die Auswirkung einer der Stentimplantation vorausgehenden Ballondilatation in drei Tieren exemplarisch getestet.

Serumgewinnung: Die Ohrvene wurde durch Rasieren oder Auszupfen der Haare dargestellt und die Haut desinfiziert. Anschließend wurde eine 24 G große Flexüle in die *V. auricularis* gelegt und natives Blut entnommen. Die Tiere bekamen die errechnete Menge Inhibitor intravenös in den Ohrvenenkatheter oder oral mit Hilfe einer Spritze verabreicht und ihnen wurde an acht Zeitpunkten innerhalb von 24 h jeweils 1 ml Blut entnommen (Zeit in min nach der Applikation: 5, 30, 60, 180, 360, 480, 720, 1440). Das Blut wurde 30 min bis zur vollständigen Gerinnung bei RT gelagert, anschließend zentrifugiert (2.000 x g), das Serum abpipettiert, aliquotiert, auf Trockeneis gelagert und bei -20 °C eingefroren. Teilweise war das Serum nach der ersten Zentrifugation geleeartig verdickt, so dass der Serumpfropf aufgrund mangelnder Pipettierbarkeit verworfen wurde. Die Zentrifugation wurde wiederholt. Die gesamte PK wurde zweimal im Abstand von vier Wochen durchgeführt, um eventuelle Veränderungen der Bioverfügbarkeit, abhängig vom Cholesterinspiegel messen zu können. Die erste Blutentnahme fand nach zwei Wochen, die zweite nach sechs Wochen fettreicher Diät statt.

Serumverarbeitung: Die Quantifizierung des Inhibitors erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-gekoppelter Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) im Labor für klinische und biophysikalische Analytik der AG Wirkstoffdesign und Analytische Chemie des Fraunhofer IZI-MWT in Halle. Die Auswertung der Daten fand am Institut für Pharmakologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald in der Abteilung klinische Pharmakologie statt. Aufgrund der erhobenen Daten (Halbwertszeit und Bioverfügbarkeit) wurde MWT-S-17 für den folgenden Versuch ausgewählt und die Dosis für die beiden Behandlungsgruppen bestimmt.

### **3.3.3.3 Behandlungsversuch**

Zwei Wochen nach Futterumstellung wurden die Tiere operiert und anschließend den Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Behandlung wurde insgesamt 28 d mit dem QC/isoQC-Inhibitor MWT-S-17 in zwei Gruppen mit den täglichen Dosierungen von 1 g/kg und 330 mg/kg alle 8 h durchgeführt. Als Positivkontrolle diente die Behandlung mit Prednison (2,1 mg/kg pro d), was laut RIBICHINI et al. (2007) in dieser Konzentration bei oraler Gabe einen positiven Effekt auf die Reduzierung der ISR im Kaninchenmodell haben soll. Die Negativkontrolle wurde nur mit Vehikel behandelt.



#### **3.3.3.4 Vehikel- und Medikamentenherstellung**

Für die Herstellung des Vehikels im Behandlungsversuch wurde eine 1 % ige HPMC Suspension verwendet (siehe unter 3.3.2.2), die 24 h vorher für insgesamt drei Medikamentengaben aller Behandlungsgruppen hergestellt und unter Rühren bei RT gelagert wurde. Die Inhibitor-konzentration in der Suspension wurde so gewählt, dass das Volumen von 15 ml bei einem Höchstgewicht der Tiere von ca. 4 kg, nicht überschritten wurde. Die entsprechende Inhibitor-HPMC-Suspension wurde unmittelbar vor der Gabe hergestellt und die Spritzen mit dem Wirkstoffgemisch in Abhängigkeit vom Tiergewicht aufgezo-gen. Einmal täglich erhielten die Tiere *p.o.* zusätzlich 40 mg Acetylsalicylsäure in 3 ml autoklaviertem Leitungswasser.

#### **3.3.3.5 Anästhesie**

Die Narkose wurde mit einem Ketamin-Medetomidin-Gemisch (0,25 mg/kg und 0,35 mg/kg) per Injektionsnarkose *i.m.* eingeleitet. Zur Analgesie wurde initial Meloxicam (1 mg/kg) *s.c.* verabreicht. Die Intubation fand blind mit einem sterilen Larynxtubus ohne „Cuff“ (Größe 2,0) statt. Die Cornea wurde durch das Auftragen von Augensalbe geschützt. Die Tiere wurden auf eine röntgendichte Carbonplatte verbracht, die mit einer Wärmematte ausgestattet war. Die Aufrechterhaltung der Narkose fand mit 2 % (v/v) Isofluran bei 40 % (v/v) Sauerstoff (O<sub>2</sub>) statt, bis die maximale alveoläre Konzentration (MAC) bei 1,1 lag. Danach konnte die Isoflurankonzentration auf 1,6 % (v/v) reduziert werden um den MAC-Wert stabil zu halten. Initial wurden folgende Narkoseparameter gewählt: Atemfrequenz mit 25/min, Frischgasfluss von 1,2 l/min, Tidalvolumen (V<sub>T</sub>) bei 40 ml. Die Narkoseüberwachung erfolgte unter Verwendung von Elektrokardiogramm (EKG), Sauerstoffsättigung (spO<sub>2</sub>) sowie der inneren Körpertemperatur.

#### **3.3.3.6 Interventionelle, kathetherbasierte Stentplatzierung**

Vorbereitung: Den Tieren wurde vor und nach dem Eingriff durch einen Venenverweilkatheter in der *V. auricularis* (siehe 3.3.3.2) Blut für das Monitoring in Form der Blutgasanalyse sowie zur Serumgewinnung entnommen. Das Operationsfeld befand sich am ventrolateralen Halsbereich und wurde nach der Haarentfernung entfettet, jodiert und mit einem sterilen OP-Tuch abgedeckt.

Chirurgischer Gefäßzugang: Der invasive Eingriff (siehe Abb. 4) begann mit einem ca. 3 cm langen Hautschnitt auf der rechten Seite parallel zur Trachea. Nachdem die Unterhaut durchtrennt wurde, konnte unter Schonung der *V. jugularis* in der Tiefe die *A. carotis communis* freigelegt werden. Einer Übererregung des *N. vagus* durch manuelle Stimulation während der Operation, wurde durch topische Applikation von 0,2 ml 2 % Lidocain vorgebeugt. Die *A. carotis communis* wurde anschließend mit Hilfe einer Irispinzette freipräpariert und vierfach angeschlungen (Surgacryl 2/0). Daraufhin wurde der proximale Abschnitt permanent doppelt ligiert und distal zwischen zwei Ligaturen eine Venenklemme gesetzt.

Nachdem der mittlere Teil des freipräparierten Gefäßes mit einer spitzen Schere inzidiert wurde, konnte dort die gespülte 5 French Schleuse mit separat verschlossenem Dilatator eingeführt werden. Die Venenklemme wurde gelöst und die Schleuse einige Zentimeter vorgeschoben. Unmittelbar nach dem Entfernen des Dilatators wurden 500 IU Heparin (in 0,5 ml NaCl), intraarteriell durch die Schleuse appliziert und diese danach über den Dreiwegehahn mit 1,5 ml Kontrastmittel-NaCl-Gemisch (1:1) gefüllt. Beide distalen Ligaturen wurden mit einem einfachen chirurgischen Knoten festgezogen um die Schleuse zu fixieren. Das Durchleuchtungsfenster des C-Bogens wurde thorakal platziert und der Gefäßverlauf mithilfe Digitaler Subtraktionsangiografie (DSA) unter Verwendung von 2 ml NaCl-Kontrastmittelgemisch identifiziert. Anschließend konnte unter radiologischer Kontrolle mittels Durchleuchtungseinheit ein 0,035`` Führungsdraht in die Schleuse eingeführt und dieser über den Aortenbogen bis in die *Aorta ascendens* geschoben werden.

Interventionelle Platzierung der Stents: Ein dünner Führungsdraht 0,014`` wurde unter radiologischer Kontrolle über die *Aorta ascendens* bis zum Abzweig der *Aa. iliacae externae* vorgeschoben. Es folgte ein Röntgenbild des Beckens sowie eine DSA mit 2 ml Kontrastmittelgemisch um den Gefäßverlauf der Aortenendaufspaltung darzustellen. Nach Generierung der „Roadmap“ wurde ein mit Kontrastmittelgemisch gefüllter und entlüfteter Ballonkatheter auf den Führungsdraht gefädelt und dieser bis in die *A. ilica externa dextra* vorgeschoben. Nach Überprüfung des korrekten Sitzes konnte dieser mit einem Druck von 8 - 10 bar mit Hilfe einer Inflationsspritze auf eine lumenfüllende Größe aufgeblasen werden (siehe Abb. 3). Nach der vollständigen Entfaltung wurde der Ballonkatheter dreimal über die gesamte Arterienlänge hin- und her bewegt, um das Gefäßendothel zu denudieren.

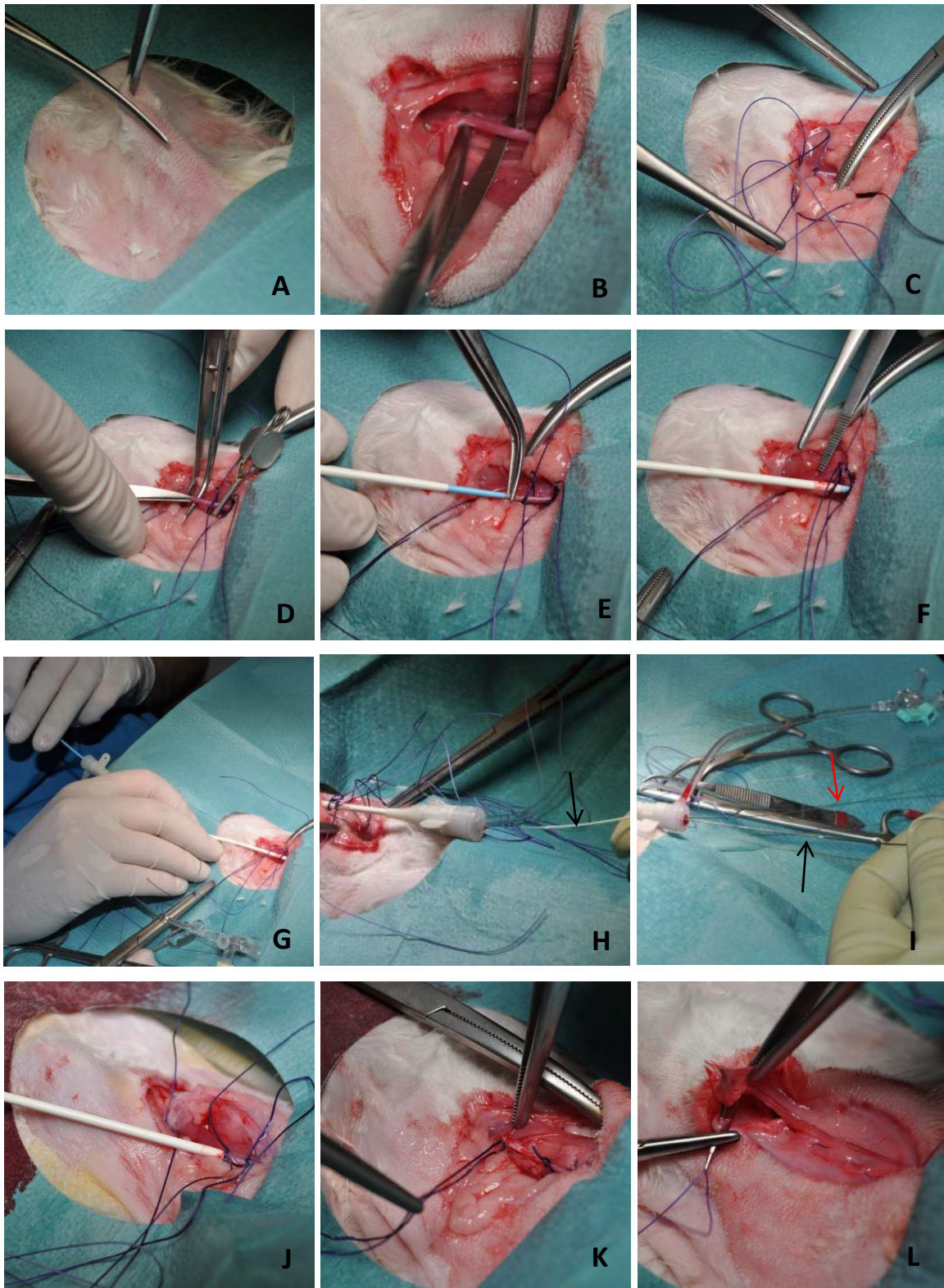
Danach wurde der Druck wieder abgelassen und Führungsdraht und Ballon in die linke Arterie vorgeschoben. Die Prozedur wurde entsprechend wiederholt, der Ballonkatheter danach entfernt und der Führungsdraht in der linken Arterie belassen. Der zuvor entlüftete Coroflex-Stentkatheter konnte über den Führungsdraht in die *A. iliaca externa sinistra* gelegt werden. Dort wurde er an der zuvor denudierten Stelle, distal des Abzweiges der *A. iliaca interna*, durch Anlegen eines Druckes von 6 – 8 bar (entsprechend einem Gefäßdurchmesser von 3 mm) implantiert. Nach 30 s wurde die Luft abgelassen, der Stentkatheter entfernt und ein neues entlüftetes System aufgebracht, was unter radiologischer Kontrolle mithilfe des Führungsdrahtes in die *A. iliaca externa dextra* vorgeschoben wurde.

Der zweite Stent wurde auf gleicher Höhe unter den gleichen Voraussetzungen implantiert. Nach Entfernung des Führungsdrahtes wurde eine Abschlussangiographie mit 2 ml Kontrastmittelgemisch durchgeführt, um Gefäßrupturen auszuschließen und die Gefäßdurchgängigkeit zu kontrollieren. Die Schleuse wurde anschließend entfernt, die *A. carotis communis* mit beiden Ligaturen permanent ligiert und die Unterhaut mit Kürschner-Naht verschlossen (3/0 Surgacryl). Die Hautadaptation fand ebenfalls mit 3/0 Surgacryl und mittels Reverdin-Nahttechnik statt. Nach Auftreten der ersten Schluckreflexe wurde das Tier extubiert und bis zum Aufwachen auf einer Wärmematte gelagert.



**Abb. 3: Angiographie bei PTA und Röntgenbild der gestenteten *Aa. iliacae externae*.**

Links: Aortenendaufspaltung mit dilatiertem Ballon in der rechten *A. iliaca externa* (weißer Pfeil); Rechts: radiologisch sichtbare bilateral implantierte Stents in den *Aa. iliacae externae* (rote Pfeile).



**Abb. 4: Einzelne Schritte der chirurgischen Präparation.**

A: Schnittführung; B: Präparation der *A. carotis communis*; C: Angeschlungene Arterie; D: Arterieninzision; E: Einführen des Dilatators; F: Einführen der Schleuse mittels Dilatator; G: Entfernen des Dilatators; H: Einführen des Ballonkatheters (Pfeil); I: Navigation des Stentkatheters (schwarzer Pfeil) auf dem Führungsdraht (roter Pfeil); J: Entfernen der Schleuse; K: Permanente Ligation der Arterie; L: Vernähen der Unterhaut

### 3.3.3.7 Belastungseinschätzung der Tiere

Während des sechswöchigen Versuches wurden die Belastungen der Tiere mittels klinischem Scoresheet untersucht. Dazu gehörten die Messung des Körpergewichtes und der Körpertemperatur, die Beurteilung des Allgemeinzustandes und des Spontanverhaltens der Tiere, sowie die Bewertung physiologischer Parameter (Futter- und Wasseraufnahme). *Post operationem* wurden zusätzlich verfahrensspezifische Kriterien, wie motorische Auffälligkeiten, verzögerte Wundheilung, *Xanthom*-Bildung oder Cholesterinausfällungen im Auge (siehe Scoresheet unter 9.4) beurteilt.

### 3.3.3.8 Blutentnahmen

Den Tieren wurde insgesamt fünfmal (vor Beginn der Cholesterindiät, am Tag der Operation, 24 h *post operationem*, nach 4 Wochen Fettdiät, bei der Abschlussangiographie) Blut aus der *V. auricularis* entnommen, um aus dem gewonnenen Serum Cholesterinwerte und Chemokin-konzentrationen messen zu können sowie ein Blutbild anzufertigen. Wache Tiere wurden im Untersuchungsbeutel fixiert. Nach Entfernung des Konus einer 23 G-Kanüle wurde Blut aus der *V. auricularis* entnommen. Die Vorbereitung der Blutentnahmestelle sowie die Verarbeitung des Serums wurden wie unter 3.3.3.2 beschrieben durchgeführt. Das Blut für die hämatologische Untersuchung wurde in Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Röhrchen aufgefangen und zeitnah gemessen.

### 3.3.3.9 Serumcholesterin und LDL-Bestimmung

Cholesterinbestimmung: Die Messung des Gesamtcholesterins im Serum fand mittels Cholesterinoxidase-para-Aminoantipyrin (CHOP-PAP) Methode am Photometer nach Herstellerangaben statt. Die ersten (physiologischen) Serumproben wurden unverdünnt gemessen, alle weiteren Proben 1:10 mit 0,9 % NaCl verdünnt. Nach Zugabe des Fällungsreagenz und 10 min Inkubation bei RT, wurde die Extinktion gegen einen Leerwert sowie einen Cholesterinstandard (TruCal) gemessen. Der Gesamtcholesteringehalt im Serum der 1:10 verdünnten Proben berechnete sich nach Formel (II).

(II)

$$\text{Gesamtcholesterin } \frac{\text{mg}}{\text{dl}} = C \text{ Standard} \times 10 \times \frac{\Delta \text{ Extinktion Probe}}{\Delta \text{ Extinktion Standard}}$$

LDL-Bestimmung: Nach Zugabe eines Fällungsreagenz in die verdünnten Serumproben konnte LDL nach 15 min Inkubation spezifisch gefällt werden. Nach 20 min Zentrifugation (2.500 x g) verblieben die Lipoproteine sehr geringer (VLDL), sowie hoher Dichte (HDL) im Überstand und konnten mittels CHOP-PAP-Methode bestimmt werden. Die LDL-Konzentration berechnete sich wie in Formel (III) und (IV) angegeben.

(III)

$$\text{Cholesterin im Überstand } \frac{\text{mg}}{\text{dl}} = C \text{ Standard} \times 10 \times \frac{\Delta \text{ Extinktion Probe}}{\Delta \text{ Extinktion Standard}}$$

(IV)

$$\text{LDL} - \text{Cholesterin } \frac{\text{mg}}{\text{dl}} = \text{Gesamtcholesterin} - \text{Cholesterin im Überstand}$$

### 3.3.3.10 CCL2-Konzentrationen im Serum

Fünf unterschiedliche Serumproben jedes Tieres (Zeitpunkte des Versuchsverlaufs siehe unter 3.3.3.8) sollten auf das frei in der Zirkulation vorhandene CCL2 mittels Sandwich ELISA getestet werden. Die optimale Serumverdünnung wurde vor dem Versuch experimentell bestimmt. Die Proben wurden unverdünnt gemäß Gebrauchsanleitung gemessen.



### 3.3.3.11 Wirkstoffprofil

Um überprüfen zu können, ob der Wirkstoff in den beiden Inhibitor-Behandlungsgruppen trotz der Formulierungsänderung in ausreichender Konzentration im Blut nachweisbar war, wurden pro Gruppe drei Tiere ausgewählt, denen nach einer ca. zwei wöchigen Behandlungsphase Blut zur Analyse abgenommen wurde. Dazu bekamen sie einen Ohrvenenkatheter aus dem 15 min vor dem nächsten Behandlungszeitpunkt Blut entnommen wurde. Anschließend wurden die Tiere behandelt und 5, 15, 30, 45, 60, 120, 240 und 480 min nach der Gabe jeweils 1 ml Blut abgenommen. Das Serum wurde wie unter 3.3.3.2 beschrieben gewonnen und quantifiziert.

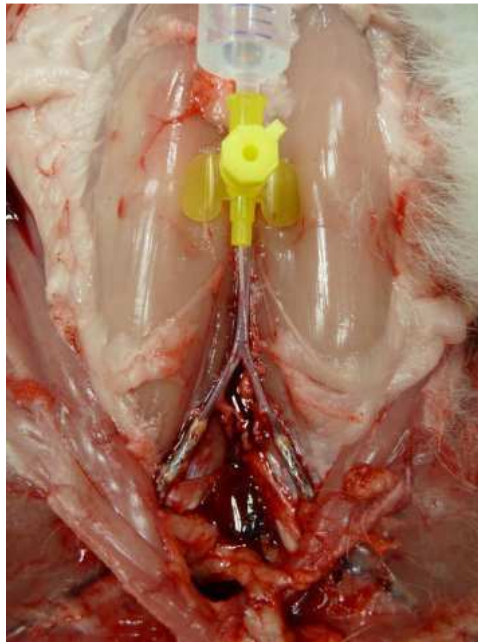
### 3.3.3.12 Versuchsende

Abschlussangiographie: Die Tiere die das reguläre Versuchsende erreichten, wurden 28 Tage nach der Stentimplantation einer Abschlussangiografie unterzogen, für die sie mittels Injektionsnarkose (Ketamin-Medetomidin) *i.m.* narkotisiert wurden. Aus der Ohrvene wurden 2 ml Blut entnommen und anschließend 500 IU Heparin in den Ohrvenenkatheter appliziert. Die Operation begann mit einem ca. 4 cm großen Hautschnitt, links parallel der Trachea. Danach wurde die Unterhaut durchtrennt, die linke *A. carotis communis* dargestellt und freipräpariert. Sie wurde mit zwei Fäden angeschlungen, *proximal* verschlossen und *distal* mit einer Venenklemme versehen. Die Arterie wurde punktiert, die Punktionsnadel vorgeschoben und die Venenklemme entfernt. Nach dem Herausziehen des Stahlmandrins wurde eine mit Kontrastmittelgemisch gefüllte Spritze auf den Konus gesteckt und der in der Arterie verbleibende Plastikschlauch fixiert. Nach einer Röntgenaufnahme des Beckens wurde eine DSA durchgeführt. Bei allen Tieren waren die gestenteten Arterien durchgängig.

Anatomisch-pathologische Präparation: Nach der Abschlussangiographie wurden die Tiere in Vollnarkose mit einer *intraarteriellen* Injektion von 800 mg Pentobarbital getötet und anschließend vollständig anatomisch-pathologisch untersucht. Der distale Aortenabschnitt sowie die *Aa. iliacae externae* wurden freipräpariert und die *Aorta abdominalis* mittels Flexüle ca. 3 cm proximal der Endaufspaltung punktiert. Beide gestenteten *Aa. iliacae externae* wurden *in situ* mit mindestens 30 ml 0,9 % iger NaCl gespült (siehe Abb. 5), anschließend ca. 5 mm distal des Stentes eröffnet und nochmals gespült. Das distale Drittel des Stents wurde mit

einer Schere abgetrennt und in flüssigem Stickstoff gelagert, um für biochemische Untersuchungen zu Verfügung zu stehen. Der verbleibende Stent wurde mit einem Teil des Gefäßes herausgeschnitten, in beschrifteten Fixierbeuteln gelagert und nach ca. 1 h Lagerung im Kühlschrank bei -20 °C bis zur histologischen Aufarbeitung nativ eingefroren.

Die Gefäße von vorzeitig verendeten oder euthanasierten Tieren wurden nach der Sektion ebenfalls mit NaCl gespült, das proximale Ende durch eine Fadenligatur markiert, bei -20 °C gelagert und vollständig in der Histologie aufgearbeitet. Von 11 Tieren wurden die Gehirne nach Perfusion durch die linke *A. carotis communis* entnommen, lamelliert und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, um für andere biochemischen Untersuchungen zur Verfügung zu stehen.



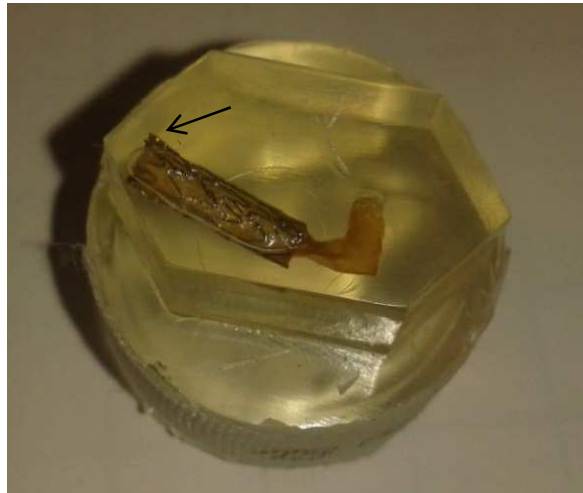
**Abb. 5: Präparation der Aortenbifurkation und Spülung der gestenteten Gefäße *in situ*.**



### 3.3.4 Histopathologische Präparation *ex vivo*

#### 3.3.4.1 Einbettung

Die Arterien wurden über Nacht im Kühlschrank gelagert und wie in Tabelle 2 beschrieben behandelt (Zusammensetzung der Materialien siehe unter 9.1.11). Nach 20 Tagen konnten die in Technovit eingebetteten Proben (siehe Abb. 6) weiter bearbeitet werden.



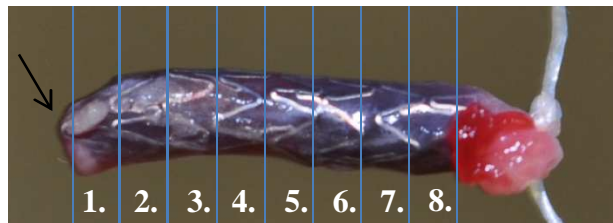
**Abb. 6: Eingebettetes gestentetes Gefäß.** Distales Drittel wurde vor der Einbettung entfernt (Pfeil).

**Tbl. 2:** Einbettungsprotokoll der gestenteten Gefäße in Technovit 9100.

Substanz	Besonderheit	Dauer
4 % PFA	8 °C	19 h
30 % Saccharose	8 °C	1 d
70% Ethanol	RT, Wechsel nach 8 h	1 d
96% Ethanol	RT, Wechsel nach 8 h	1 d
Abs. Ethanol	RT, Wechsel nach 8 h	1 d
Xylol	RT, Wechsel nach 8 h	1 d
Xylol/Technovit 9100 Basisflüssigkeit	RT	1 d
Präinfiltration I	10 min Vakuum, Lagerung bei 8 °C	3 d
Präinfiltration II	10 min Vakuum, Lagerung bei 8 °C	3 d
Infiltration	10 min Vakuum, Lagerung bei 8 °C	3 d
Polymerisation	10 min Vakuum, Lagerung bei -10°C	3 d
Ausbettung	Lagerung bei 8 °C	1 d
	Lagerung bei RT, danach ausbetten	2 h

### 3.3.4.2 Histologische Präparation

Die eingebetteten Proben wurden in Anlehnung an die Trenn-Dünnschliff-Technik bearbeitet. Schnittebene, -anzahl und entsprechende Färbungen wurden vorher festgelegt (siehe Abb. 7). Der erste Schliff wurde am abgetrennten Gefäßabschnitt angefertigt, was dem *medialen* Stentabschnitt entsprach. Jeweils der erste Dünnschliff beider Segmente (*medial* und *proximal*) wurde für die Übersichtsfärbung verwendet. Der folgende Schliff (Nr. 2 und 6) beider Abschnitte wurde für die Immunhistologie präpariert und dafür auf Glasobjektträger geklebt. Der 3. und 7. Schliff diente der morphologischen Untersuchung und die übrigen beiden konnten, für den Fall das einzelne Schliffe beschädigt waren oder nachgefärbt werden mussten, als Reserve verwendet werden.



**Abb. 7: Angefertigte Schnittebenen der gestenteten Gefäße.** Native Probe einer gestenteten Arterie, ca. 8 mm groß. Der *distale* Abschnitt (Pfeil) ist abgetrennt. Die Schliffebenen sind von 1. bis 8. durchnummeriert. 1. – 4. entspricht dem *medialen* Stentabschnitt, 5. – 8. dem *proximalen*.

Die in Technovit eingebetteten Präparate wurden in die mechanische Klemmvorrichtung des Trennschleifgerätes eingespannt und daraus ca. 600 µm dicke, planparallele Schliffe gesägt. Diese Schliffe wurden auf der dem Sägeblatt abgewandten Seite manuell mit Schleifpapier der Körnung 1200, 2400 und 4000 geschliffen und poliert. Anschließend wurde die Dicke der Probe mit einer Mikrometerschraube gemessen und der Schliff auf der bearbeiteten Seite mit Technovit 7210 Kleber bestrichen. Mit der Präzisions-Klebepresse wurde der Kunststoffobjektträger mittels Vakuum an der Grundplatte der Presse fixiert und der mit Kleber bestrichene Schliff auf die Bodenplatte gelegt. Diese wurde mithilfe eines Gewichtes gegen die durchsichtige Deckplatte und somit unter Sichtkontrolle gegen den Objektträger (OT) gepresst. Anschließend wurde ein Ultraviolettstrahler über der Probe installiert, sodass der Kleber für 10-15 min aushärten konnte (siehe Abb. 8).

Um die Schliffe histologisch Färben zu können, sollten diese eine Schliffdicke von unter 100 µm aufweisen. Dafür wurde ein Schleifgerät verwendet, an dem der Objektträger mittels Vakuum angebracht und auf einen beweglichen, durch einen Motor betriebenen Schleifteller mit Schleifpapier einer Körnung von 1200 abgesenkt werden konnte. Zwischendurch wurde der Objektträger immer wieder abgenommen, seine aktuelle Gesamtdicke (Probe + Klebeschicht + OT) gemessen und die Probendicke mittels Formel (V) und (VI) berechnet.

(V)

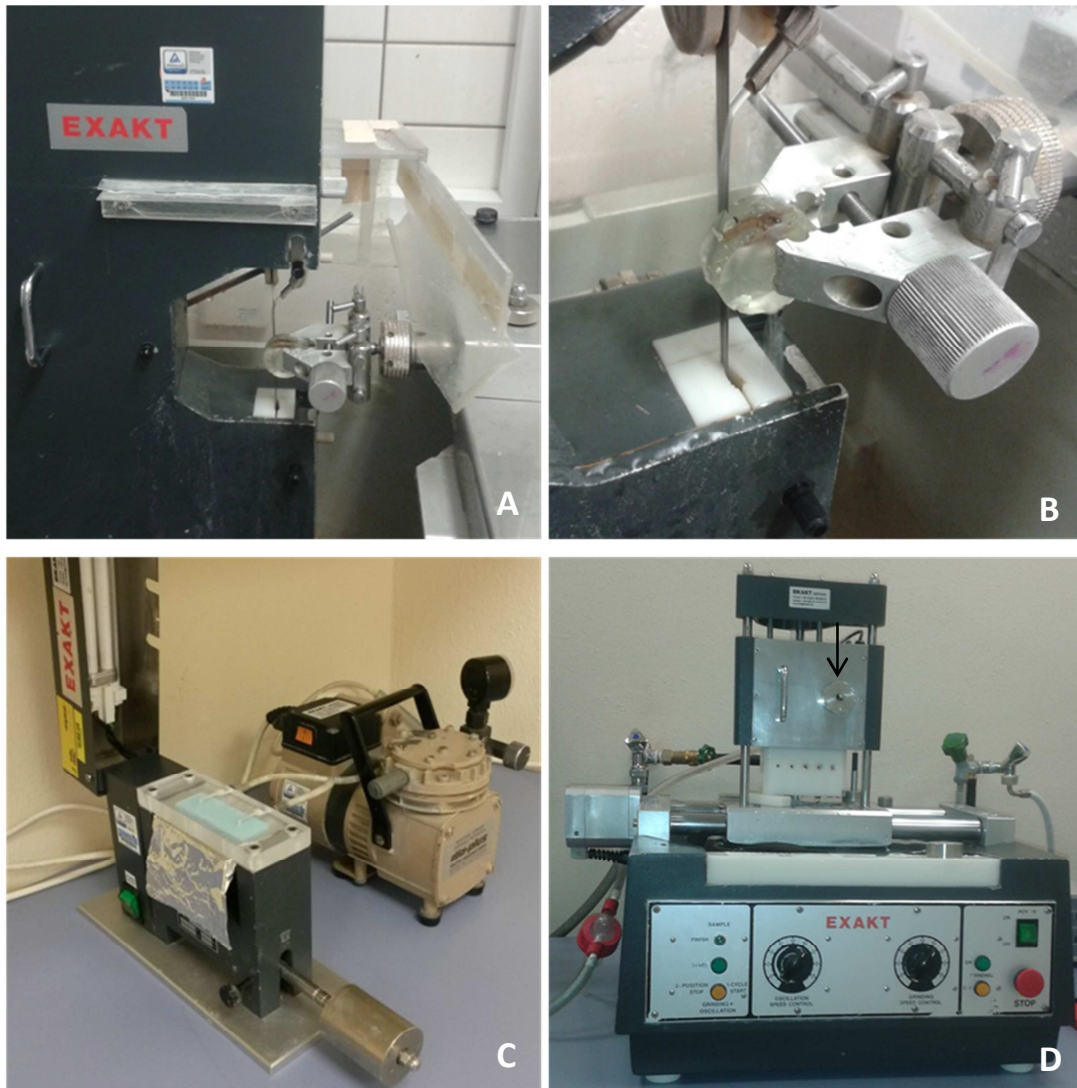
$$\text{Klebeschicht } \mu\text{m} = \text{Gesamtdicke} - \text{OT} - \text{Probendicke}$$

(VI)

$$\text{aktuelle Probendicke } \mu\text{m} = \text{Gesamtdicke} - \text{OT} - \text{Klebeschicht}$$

Wenn die Probe eine Dicke von ca 80 µm erreicht hatte, wurde der Schliff auf die gleiche Weise erst mit 2400, dann mit 4000 Schleifpapier poliert. Die Länge der Polierschritte ist abhängig von der Glätte der Schliffoberfläche, die immer wieder im Stereomikroskop überprüft werden kann.

Vor jeder konventionellen Färbung wurden die Proben 2 min in 0,1 % Ameisensäure angeätzt, 1 min in Leitungswasser gespült und anschließend für 2 h in Methanol neutralisiert. Nach dem erneuten Spülen in Leitungswasser konnte mit den Färbungen begonnen werden.



**Abb. 8: Verwendete Geräte der histologischen Bearbeitung.** A: Trennschleifsystem mit Kühl- und Spülvorrichtung; B: eingespanntes Technovitpräparat; C: Präzisions-Klebpresse für Ultraviolett-härtende Klebung unter direkter Sichtkontrolle; D: Schleifsystem mit Vakuumhalter, rotierendem Drehteller und Spül-/Kühlflüssigkeit. Durch manuell anpassbare Gewichte (Pfeil) wird der Druck der Probe auf den Schleifteller reguliert.

### 3.3.4.3 Giemsa Färbung

Um die Proben auf Entzündungszeichen zu untersuchen, wurde jeweils der letzte Schliff des *proximalen* und des *medialen* Stentstückes mittels Giemsa-Färbung gefärbt (siehe Tbl. 3 und unter 9.1.13), um die Entzündungszellen beurteilen zu können. Die konventionelle Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) ließ sich bei Dünnschliffpräparaten nicht etablieren, da sich die Kerne ohne Entplastungsschritt nicht anfärben lassen.

**Tbl. 3:** Färbeprotokoll für die Giemsa-Färbung am Dünnschliff.

Färbeschritte	Zeit
Giemsalösung 1:10 mit abgekochtem ddH <sub>2</sub> O	30 min bei 60 °C
Spülen in abgekochtem ddH <sub>2</sub> O	30 s
Spülen in abgekochtem ddH <sub>2</sub> O mit 4 Tropfen Eisessig	2 min
Kontrolle unter dem Mikroskop, ggf. differenzieren durch Spülen in 70 % Ethanol	

**3.3.4.4 Modifizierte Movat-Pentachrom Färbung nach VERHOEFF**

Für die morphometrische Auswertung wurde jeweils der zweite Schliff beider Stentsegmente ausgewählt und Movat-Pentachrom gefärbt (siehe Tbl. 4 und unter 9.1.12). Bei beschädigten oder unvollständigen Proben wurden die entsprechenden Reserveschliffe gefärbt und ausgewertet.




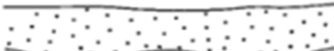
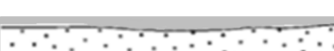
**Tbl. 4:** Färbeprotokoll für die modifizierte Movat-Pentachrom Färbung nach VERHOEFF am Dünnschliff.

Färbeschritte	Zeit
Alcianblau	30 min
Waschen in 70 °C heißem Leitungswasser	3x Küvettenwechsel
Working Hematoxylin-Lösung	20 min
Bläuen in handwarmem Leitungswasser	20 min (3x frisches Wasser)
2 % FeCl <sub>3</sub>	45 s
Waschen in warmem Leitungswasser	3 x
5 % Natriumthiosulfat	1 min
Waschen unter laufendem Leitungswasser	1, 5 min
Spülen in ddH <sub>2</sub> O	1x
Woodstain Scarlet Working Solution	20 min
Waschen in ddH <sub>2</sub> O	15 x dippen
0,5 % Essigsäure	10 x dippen
5 % Phosphowolframsäure	5 min
Waschen in ddH <sub>2</sub> O	2 x dippen
0,5 % Essigsäure, danach Schliffe abtropfen lassen	8 s
96 % Ethanol	1 min
100 % Ethanol	2 x 1 min
Alkoholische Safran-Lösung	25 min

### 3.3.4.5 Entzündungszeichen

Jeweils ein Giemsa gefärbter Schliff beider Stentsegmente, wurde in der Übersichtsansicht (4-fach vergrößert) in vier Quadranten geteilt und der mittlere Bildausschnitt jedes Quadranten 40-fach vergrößert aufgenommen. Die Mitte des Bildausschnittes wurde mit Hilfe der folgenden, aus der Literatur entnommenen, Scores beurteilt und als ordinale Daten erhoben. Der Neue Verletzungsscore („New injury score“), in Tabelle 5 dargestellt, ist eine Kombination aus tiefem Verletzungsscore nach SCHWARTZ und dem Media-Kompressionsscore nach WALES (GUNN et al. 2002). Der in Tabelle 6 dargestellte Entzündungsscore („Inflammation Score“) beurteilt nach CARTER et al. (2004) die Anzahl der Entzündungszellen um die Streben und wurde durch die Erweiterung um Punkt 4 modifiziert. Der Endothelialisierungsscore („Stent endothelialization score“) gibt das Ausmaß der Endothelzellbedeckung des neuen Lumens an (CARTER et al. 2004) und wurde ebenfalls um Punkt 0 und 4 erweitert (siehe Tbl. 7).

**Tbl. 5:** Neuer Verletzungsscore.

Score	Beschreibung	Bildliche Darstellung
0	Kein Eindringen der Stentstreben in die <i>Tunica media</i> Keine Deformation der <i>Lamina elastica interna</i>	
1	Stent induzierte ggr. - mgr. Dehnung der <i>Tunica media</i> Deformation der <i>Lamina elastica interna</i> um $< 45^\circ$	
2	Stent induzierte mgr. – hgr. Dehnung der <i>Tunica media</i> Deformation der <i>Lamina elastica interna</i> um $> 45^\circ$	
3	Stent induzierte tiefe Verletzung der <i>Tunica media</i> Ruptur der <i>Lamina elastica interna</i>	
4	Stent induzierte tiefe Verletzung der <i>Tunica media</i> Ruptur der <i>Lamina elastica externa</i>	

**Tbl. 6:** Entzündungsscore.

Score	Beschreibung
0	Keine Entzündungszellen
1	Vereinzelte Entzündungszellen
2	Entzündungszellen umgeben $\geq 50$ % einer Stentstrebe bei 25 - 50 % aller Stentstreben
3	Entzündungszellen umgeben eine Stentstrebe bei 25 - 50 % aller Stentstreben
4	Entzündungszellen umgeben eine Stentstrebe bei 50 - 100 % aller Stentstreben

**Tbl. 7:** Endothelialisierungsscore.



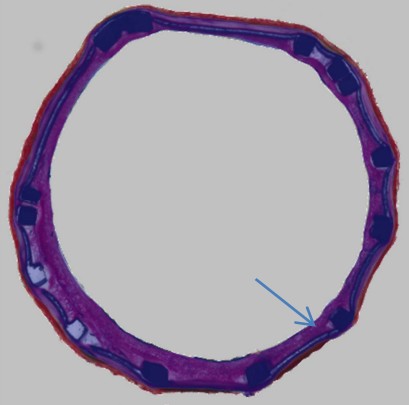
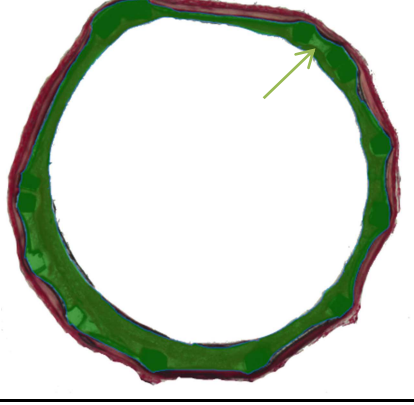
Score	Ausmaß des Endothelialisierungsgrades
0	0 %
1	< 25 %
2	25 – 75 %
3	> 75 %
4	100 %

### 3.3.4.6 Morphometrische Auswertung

Die Movat-Pentachrom gefärbten Proben (zwei pro Stent) wurden in 40-facher Vergrößerung digitalisiert und mittels Analysesoftware Cell F die in Tabelle 8 aufgeführten Parameter bestimmt. Alle abgebildeten Gefäßquerschnitte der morphometrischen Auswertung wurden mit dem Programm GIMP 2.8.16 bearbeitet (vergleiche Anhang 9.2).

Die finalen Ergebnisse wurden, wie in Tabelle 9 dargestellt, aus den histologisch bestimmten Parametern berechnet.

**Tbl. 8:** Erhobene Parameter der histologischen Morphometrie.

Parameter	Methode & Programm	Bildmaterial
Stentstreben- fläche	manuelle Umrandung  „Area Measure“	
Fläche des verbleibenden Lumens	manuelle Umrandung  „Area Measure“	
Probengesamt- fläche	Neointima und Media- fläche (nach manueller Entfernung von Artefak- ten und der Adventitia aus dem Messbereich)  „Hybrid Cell Counter“	
Neointimafläche	Neointima (nach manu- eller Entfernung der Mediafläche aus dem Messbereich)  „Hybrid Cell Counter“	



**Tbl. 9:** Ergebnisberechnung der histologisch bestimmten Daten.

Parameter	Berechnung
Neointima- fläche	<i>Neointima – Stentstrebenfläche</i>
Fläche des verbleibenden Lumens	direkt gemessen
% verbliebe- nes Lumen	$\frac{\text{Fläche verbleibendes Lumen}}{\text{Fläche verbleibendes Lumen} + (\text{Neointima} - \text{Stentstrebenfläche})} * 100$
% Stenose	$100 - \% \text{ verbleibendes Lumen}$
Mediafläche	<i>Probengesamtfläche – Neointimafläche</i>
N/M	$\frac{\text{Neointimafläche}}{\text{Mediafläche}}$

### 3.3.4.7 Immunhistologische Methoden

Die Einbettmethode mit Technovit 9100 wurde gewählt um immunhistologische Färbungen möglich zu machen. Da keine Schnitte am Mikrotom unter Strukturertalt angefertigt werden konnten, kam die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Anwendung. Die Probendicken, die bei dieser Methode entstehen, liegen zwischen 40 und 60 µm. Da die Probenvorbereitung für die Immunhistologie eine Entplastung voraussetzt, damit der Primärantikörper binden kann, muss das Technovit vorher entfernt werden. Das stellte sich aufgrund der enormen Probendicke als nicht vollständig möglich dar. Entplastungsversuche fanden (auf Glasobjektträgern) mit Methoxyethylacetat und Xylol statt. Sowohl durch wochenlangen Verbleib der Proben in den Lösungsmitteln (bei täglichem Wechsel der Flüssigkeiten) oder durch Erwärmen von Xylol auf 55 °C konnte keine vollständig entplastete und damit geeignete Probe gewonnen werden. Somit konnte keine Aussage über den Einfluss des QC/isoQC-Inhibitors MWT-S-17 auf die histologisch nachweisbare Monozytenkonzentration getroffen werden.

### **3.3.5 Biochemische Untersuchungen *ex vivo***

Das distale Drittel des Stentes wurde bei allen Tieren, die das reguläre Versuchsende erreichten, mit einer Schere abgetrennt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Nachfolgende Untersuchungen sollten einerseits die spezifische QC/isoQC-Aktivität im Gefäß in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe der Versuchstiere zeigen, wofür die gewonnenen Proben der rechten Körperseite verwendet wurden. Andererseits wurden die Proben der linken Seite einer Genexpressionsanalyse von QC/isoQC sowie der Untersuchung der RNA-Konzentration von CCL2 zugeführt.

#### **3.3.5.1 QC/isoQC-Aktivität im gestenteten Gefäß**

##### **3.3.5.1.1 Probenaufschluss**

Mindestens zwei Gefäße der Tiere einer Behandlungsgruppe wurden zusammengefasst, um die benötigte Gewebemenge von 50 mg pro Aufschluss zu erreichen. Eine Proteaseinhibitor (PI) Mix-Tablette wurde in 10 ml Aufschlusspuffer gelöst und 500 µl kalter PI-Mix in Homogenisatorröhrchen vorgelegt. Nach Überführung der auf Eis gelagerten Gefäßabschnitte wurde der BMS manuell entfernt und die Gewebsmasse ermittelt. Die Proben wurden zweimal für 30 s (6.500 x g) homogenisiert und anschließend 2 x 2 min bei 4 °C zentrifugiert (10.000 x g). Anschließend wurde mit der zusätzlich errechneten Menge PI-Mix (10 µl PI-Mix pro mg) nachgespült, um die Gewebereste von den Keramik-Kügelchen des Homogenates vollständig zu trennen. Danach wurden die Proben dreimal für 10 s sonifiziert und zwischendurch auf Eis gekühlt. Der Aufschluss wurde für 30 min bei 4 °C zentrifugiert (13.000 x g) und der Überstand bei -20 °C gelagert.

##### **3.3.5.1.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Die Bradford-Konzentrationsbestimmung beruht auf der Bindung eines Triphenylmethan-Farbstoffes (Coomassie-Brilliant-Blau G250) an Proteine in saurer Lösung, die eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm zu Folge hat. Für die Proteinbestimmung der Proben wurden diese 1:4 mit Bradford-Reagenz gemischt und 10 min im

Dunkeln inkubiert. Die Proteinkonzentration ergab sich in mg/ml durch die gemessene Probenextinktion sowie einer zuvor mit Bovinem Serum Albumin (BSA) bestimmten Eichgeraden (siehe Formel (VII)).

(VII)

$$y = 0,5868 x - 0,0002$$

#### **3.3.5.1.3 Probenvorbereitung**

Zu Beginn wurden eine 100 µM Gln-βNA- und eine 500 µM N-Ethylmaleimide (NEM)-Lösung in 25 mM MOPS-Puffer (pH 7) bereitgestellt. Je Inkubationsansatz wurden 500 µl Gln-βNA und 400 µl der NEM-Lösung vorgelegt und bei 30 °C und 300 rpm geschüttelt. Zum Start der Inkubationszeit wurden 100 µl der aufgeschlossenen Probe zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Zeitgleich wurden 100 µl des Gemisches wieder entnommen und im kochenden Wasserbad für 5 min inaktiviert. Neben dem Zeitpunkt 0 wurde nach 5, 10, 15, 22, 30, 45 und 60 min eine Probe entnommen und inaktiviert. Alle Proben wurden auf Eis inkubiert und nach der letzten Entnahme gemeinsam für 20 min bei 4 °C (13.000 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20 °C gelagert.

#### **3.3.5.1.4 Hochleistungsflüssigkeitchromatographie**

Vor jeder Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (HPLC) Messung wurde die ersten 30 min eine Basislinie aus dem Gemisch der Laufmittel A (ddH<sub>2</sub>O und 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA)) und B (Acetonitril und 0,1 % TFA) aufgenommen. Die Proben (ca. 30 µl) wurden während der gesamten Messzeit auf 7 °C gekühlt. Zur Reinigung der Injektionsnadel erfolgte zunächst eine Injektion mit 20 µl ddH<sub>2</sub>O, bevor die gewünschten Proben über die Säule aufgetrennt wurden. Für jede Injektion wurde dabei das in Tabelle 10 dargestellte Programm zur Trennung von Gln-βNA und pGlu-βNA absolviert. Nach der Messung wurde die Säule für mindestens 30 min mit dem Laufmittel C (Acetonitril und ddH<sub>2</sub>O (1:1)) gereinigt.

**Tbl. 10:** Darstellung des HPLC-Programms zur Trennung von Gln- $\beta$ NA und pGlu- $\beta$ NA.

Messzeit in min	Anteil Laufmittel A in %	Anteil Laufmittel B in %	Anteil Laufmittel C in %
0	77	23	0
8	55	45	0
10	5	95	0
15	5	95	0
20	77	23	0
30-60	0	0	100

### 3.3.5.1.5 Erstellung einer Kalibriergeraden

Zur Quantifizierung der Messungen musste eine Kalibriergerade erstellt werden. Hierzu wurde eine 500  $\mu$ M-Lösung des Produktes pGlu- $\beta$ NA in 25 mM MOPS-Puffer (pH 7) vorbereitet und in 7 verschiedene Konzentrationen (62,5  $\mu$ M, 31,25  $\mu$ M, 16,625  $\mu$ M, 7,812  $\mu$ M, 3,906  $\mu$ M, 1,953  $\mu$ M, 0,976  $\mu$ M) verdünnt. Bei 30  $\mu$ l jeder Verdünnungsstufe wurde die Extinktion gemessen. Die Fläche unter den Extinktionspeaks von pGlu- $\beta$ NA wurde in Abhängigkeit von der entsprechenden Konzentration aufgetragen und eine lineare Regressionsgerade aus den Daten bestimmt.

### 3.3.5.2 Genexpressionsanalysen

#### 3.3.5.2.1 RNA-Isolation

Zur Ermöglichung der Einzelbestimmung der Probe wurde für die Isolation der RNA mittels RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit ca. 30 mg Gewebe eingesetzt. Für die relative Quantifizierung der PCR-Daten wurde nach mechanischer Zerkleinerung zusätzlich RNA aus ca. 20 mg Ausgangsmaterial einer ungestenteten Aorta eines unbehandelten Kaninchens isoliert. Die Vorgehensweise erfolgte, bis auf die Proteindenaturierung (für die Tris(2-carboxyethyl)-phosphin verwendet wurde), nach Herstellerangaben. Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt.

### 3.3.5.2.2 cDNA-Synthese

Zur besseren Vergleichbarkeit der Proben wurden jeweils 500 ng RNA in die entsprechend komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Synthese erfolgte dabei in zwei Schritten. Der erste Ansatz, der aus 12 µl Gesamtvolumen (x µl RNA, y µl H<sub>2</sub>O, 1 µl random Primer, 1 µl dNTPs) bestand, wurde für 65 °C für 5 min und anschließend für 2 min bei 25 °C behandelt. Anschließend wurden 8 µl des folgenden Ansatzes hinzugegeben: 4 µl Puffer (5x), 2 µl 1,4-Dithiothreitol, 1,5 µl H<sub>2</sub>O, 0,5 µl Superscript II. Es lief folgendes Programm ab: 25 °C für 10 min, 42 °C für 50 min, 70 °C für 15 min.

### 3.3.5.2.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Für die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wurden die beschriebenen Primerpaare (siehe 9.1.5) für die zu untersuchenden Gene benötigt. Je Reaktionsansatz (1 µl cDNA, 7,5 µl SYBR Green, 0,75 µl Primermix (Vorwärts- und Rückwärtsprimer 1:2 mit H<sub>2</sub>O), 5,75 µL H<sub>2</sub>O) wurde das in Tabelle 11 beschriebene PCR-Programm verwendet.

**Tbl. 11:** PCR-Programm zur Amplifikation der Ziel-DNA für die Genexpressionsanalysen.

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	1
Denaturierung	95 °C	20 s	40
Primer-Bindung	60 °C	15 s	40
Elongation	schrittweise Erhöhung von 60 °C auf 99 °C		

### 3.3.5.2.4 Relative Quantifizierung der Genexpression

Bei der relativen Quantifizierung wird die gemessene Genexpression im Verhältnis zu einer internen Kontrolle (Referenzgene) dargestellt. Referenzgene zeichnen sich durch ihre ubiquitäre und homogene Expression aus. Dadurch werden Gewebe- und Matrixeffekte der Proben reduziert. Zudem betreffen Fehler bei der PCR innerhalb einer Probe sowohl das Referenz- als auch das Zielgen. Aufgrund der Tatsache, dass die gesamte Analyse auf den Signalen der Referenzgene beruht, ist deren Auswahl und Qualität von großer Bedeutung. Üblicherweise

werden mehrere Referenzgene in einer Analyse mitgeführt, um mögliche Schwankungen und Messungenauigkeiten auszugleichen. Hier wurden die Referenzgene Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) und Tyrosin-3-Monooxygenase/Tryptophan-5-Monooxygenase aktivierendes Protein (YWHAZ) verwendet, aus denen zur weiteren Berechnung ein Mittelwert (MW) gebildet wurde (Ref.2G). Die genauen Messdaten befinden sich in Tabelle 29 unter 9.6.3. Im Folgenden wird das Rechenmodell vorgestellt, was zur relativen Quantifizierung verwendet wurde.

Comparative Quantification: Diese Methode ist eine Effizienzkalkulation, die auf den Amplifikationswerten der PCR basiert. Zur Verfolgung der Amplifikation wird ein Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt. Das hier verwendete SYBR Green bindet an doppelsträngige DNA, so dass deren Menge direkt mit der Fluoreszenz korreliert. Zur Quantifizierung dient der Bereich des exponentiellen Anstiegs der Fluoreszenzkurve, da in diesem Bereich die Amplifikationseffizienz bei ca. 100 % liegen sollte. In der weiteren Berechnung wird eine Probe als sogenannter „Kalibrator“ ausgewählt, dessen Amplifikationseffizienz als Vergleichswert herangezogen wird. Es eignet sich z.B. eine experimentell unbehandelte Probe, hier ein ungestentetes Gefäß eines unbehandelten Tieres. Die Effizienz wird zur Berechnung der DNA-Konzentration im Verhältnis zum Kalibrator (comparative concentration, cc) genutzt. Mit Hilfe von mitgeführten Referenzgenen können die Werte der Zielgene normiert werden, so dass mögliche Expressionsunterschiede veranschaulicht werden können (siehe Formel (VIII)).

(VIII)

$$cc(\text{Zielgen, normiert}) = \frac{cc(\text{Zielgen})}{cc(\text{Referenzgen})} ; \quad \text{z.B.:} \quad \frac{cc(\text{CCL2})}{cc(\text{Ref.2G})}$$

### 3.3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Beratung erfolgte durch das Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie der Universität Leipzig. Die stentbezogenen Messwerte wurden zunächst auf Normalverteilung geprüft. In dem hier durchgeführten Tierversuch wurden pro Tier zwei Stents implantiert, die als separate Proben betrachtet werden sollten. Dafür wurden die entsprechenden Messwerte der rechten und linken Stents gegeneinander aufgetragen. Mittels eines Mischmodells wurden die Werte für jedes Tier, abhängig von der Körperseite und dem Ort der Probe (*medial/proximal*) mit einem eingeführtem Korrekturwert statistisch berechnet. Das Ergebnis des Verfahrens konnte bestätigen, dass die Seite (rechts oder links) des Stents keine Rolle auf den erhobenen Parameter hat und es eine hohe Varianz zwischen den Tieren gibt. Allerdings wiesen die *proximal* erhobenen Stichproben signifikant mehr Neointimabildung (und damit einen höheren Restenosegrad) auf als die *medialen* Schliffe. Dieses Ergebnis wurde durch erhöhte Varianzen bestimmt. Aufbauend auf die Erkenntnisse des Mischmodells konnten die Stents eines Tieres als unterschiedliche Proben wahrgenommen und ausgewertet werden.

Die darauf folgende Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPadPrism (GraphPad Software, Version 5.03, La Jolla, USA). Die Stentparameter wurden mittels one-way ANOVA analysiert und bei erreichtem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  durch einen Tukey post-hoc Test mit 95 % Konfidenzintervall korrigiert. Es wurden nur die Stents der Tiere ausgewertet, die das reguläre Versuchsende erreichten ( $n = 26$ ). Die statistische Analyse aller im Serum erhobenen Parameter der Tiere wurde als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardabweichungen in entsprechenden Diagrammen angegeben. Eine Auswahl wurde graphisch im Ergebnisteil dargestellt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 *In vitro* Versuche

#### 4.1.1 Herstellung der Kaninchen-QC

Ziel dieses Versuchsabschnittes war es, die rQC *in vitro* in ausreichender Menge zu generieren, sodass eine  $K_i$ -Wert Bestimmung von MWT-S-17 und MWT-S-18 für das Kaninchen vorab durchgeführt werden konnte.

Das Expressionsplasmid wurde mittels molekularbiologischer Methoden hergestellt, in *E. coli* amplifiziert, die DNA sequenziert und mit der Originalsequenz verglichen. Nach der Elektroporation von *P. pastoris* und Vergleich der Expressionsquantität durch QC-spezifische, fluorometrische Aktivitätsmessung kann davon ausgegangen werden, dass die Herstellung der rQC *in vitro* in dem benötigten Umfang funktioniert hat (nicht gezeigt).

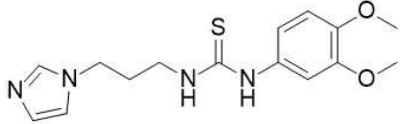
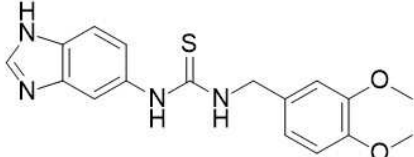
#### 4.1.2 Charakterisierung von MWT-S-17 und MWT-S-18 *in vitro*

Die exprimierte rQC wurde für die  $K_i$ -Wert Messung von MWT-S-17 und MWT-S-18 verwendet. Diese und andere Parameter sind in Tabelle 12 dargestellt. Dabei wurden die  $K_i$ -Werte mit denen der humanen (hQC/hisoQC) sowie der murinen (mQC/misoQC) Enzyme verglichen, die nicht im Rahmen dieser Arbeit entstanden, sondern aus der Literatur entnommen werden konnten. Die  $K_i$ -Werte der verschiedenen QCs liegen in der gleichen Größenordnung von ca. 150 nM. Die Hemmkonstanten beider isoQCs sind mit 236 und 246 nM noch ähnlicher.

Beide Inhibitoren haben eine ähnliche chemische Struktur sowie eine molekulare Masse in der Größenordnung von 330 g/mol. Das wesentliche Merkmal zur Interaktion mit dem Zinkion des aktiven Zentrums von QC/isoQC, ist in MWT-S-17 ein Imidazolring und in MWT-S-18 ein Benzimidazolring. MWT-S-18 liegt zu einem wesentlich größeren Teil an Plasmaproteinen gebunden vor als MWT-S-17. Die Säurekonstante ( $pK_a$ ) beider Inhibitoren liegt im Bereich für mittelstarke bis schwache Basen. Der positive n-Octanol-Wasserverteilungskoeffizient ( $\log P$ ) gibt die Lipophilie beider Stoffe an, die bei MWT-S-18 geringgradig höher ist.



**Tbl. 12:** Substanzvergleich von MWT-S-17 und MWT-S-18.

	<b>MWT-S-17</b>		<b>MWT-S-18</b>	
Chemische Gruppe	Imidazol-Derivat		Benzimidazol-Derivat	
Struktur				
Molekulargewicht	320,41 g/mol		342,415 g/mol	
Plasmaproteinbindung	„Fraction unbound“ (FU): 67 %		FU: 23,2 %	
Humanes Serum Albumin (HSA) <sup>A</sup>	„Fraction bound“ (FB): 33 %		FB: 76,8 %	
pK <sub>a</sub> <sup>B</sup>	6,79		5,87	
logP <sup>B</sup>	1,64		2,68	
Löslichkeit in DTP-10	14,75 mg/ml		3,15 mg/ml	
Löslichkeit im Zeitverlauf (≥ 24 h)	6,3 mg/ml		1,87 mg/ml	
Viabilität der Zellen in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration 0,1 - 100 µM	SH-SY5Y	Hep G2	SH-SY5Y	Hep G2
	100 %	100 %	100 %	100 %
K <sub>i</sub> -Wert (bei pH 8) rQC	210,33 (± 45,79) nM		131,67 (± 57,79) nM	
K <sub>i</sub> -Werte (bei pH 8) der hQC / hisoQC (pH 8) <sup>C</sup>	71 nM / 236 nM		Nicht bekannt Nicht bekannt	
K <sub>i</sub> -Werte (bei pH 8) der mQC / misoQC <sup>C</sup>	170 nM / 246 nM		Nicht bekannt Nicht bekannt	

<sup>A</sup> bestimmt mit TRANSILXL PPB Binding Kit von Sovicell, Leipzig

<sup>B</sup> berechnet mit Marvin Sketch 6.1.5

<sup>C</sup> Angaben aus CYNIS et al. 2008, (MWT-S-17 = PQ 50)

## 4.2 Pharmakokinetik

### 4.2.1 Quantifizierung von MWT-S-17 und MWT-S-18

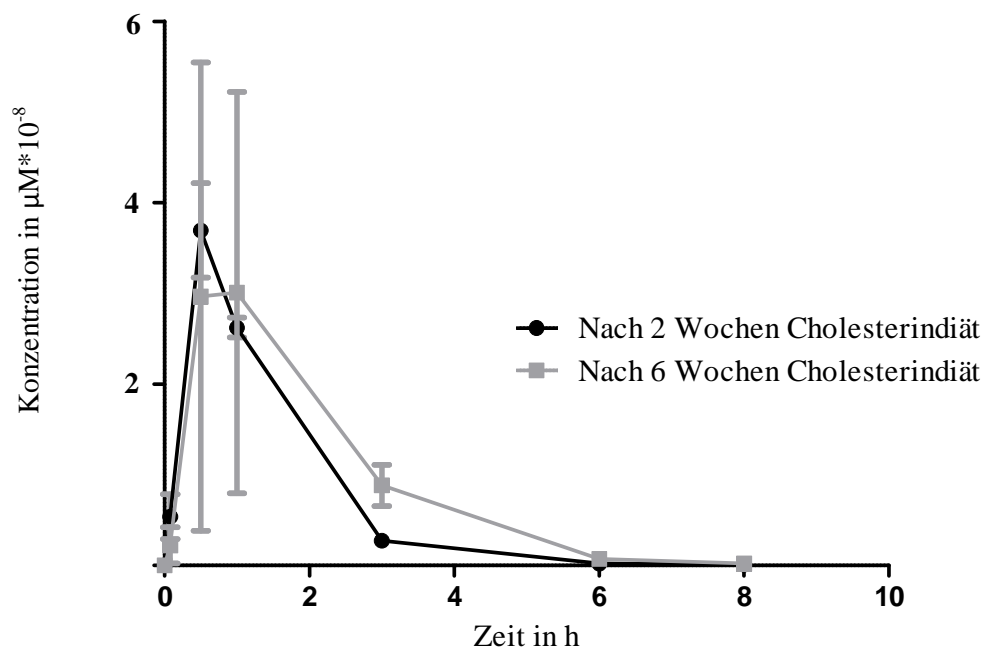
Der Vorversuch diente der Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter der Inhibitoren (Halbwertszeit, Bioverfügbarkeit, maximale Wirkstoffkonzentration) *in vivo*. Durch den Vergleich der gewonnenen Daten konnte die Auswahl des pharmakokinetisch potenter wirkenden Stoffes im Kaninchen fundiert getroffen werden.

Die erste pharmakologische Untersuchung fand nach 2 Wochen Cholesterindiät, die zweite nach 6 Wochen statt. Ziel der Versuchswiederholung zu einem späteren Zeitpunkt, war herauszufinden, ob die Dosis im Laufe des Versuches an die veränderten Cholesterinkonzentrationen im Blut der Tiere angepasst werden musste. An den Kurvenverläufen in Abhängigkeit der Versuchsdauer (Abb. 9 und 10) ist zu erkennen, dass es bei MWT-S-17 zu keiner Beeinflussung der Resorption durch die cholesterinhaltige Diät kommt. MWT-S-18 verhält sich analog dazu und ist hier nicht dargestellt. Die Dosis konnte im Folgeversuch über die Behandlungsdauer von vier Wochen konstant gehalten werden.

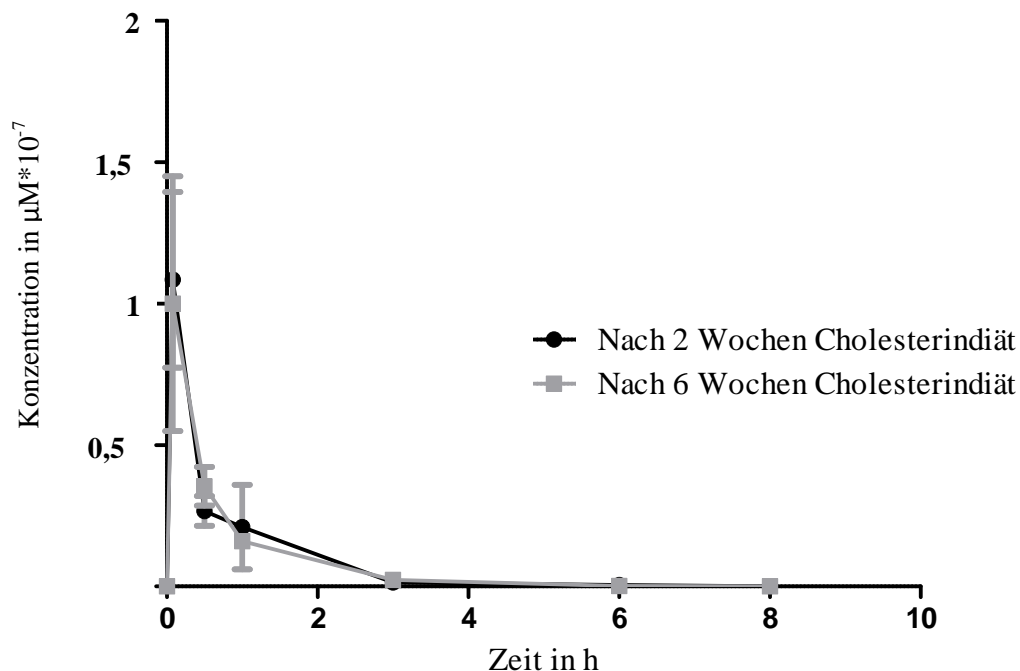
In den folgenden Abbildungen (9, 10 und 12) sind die gemessenen Konzentrationen von MWT-S-17 zur besseren Vergleichbarkeit mit Hilfe der Formel (IX) unter Einbezug der molekularen Masse  $M = 320,41 \text{ g/mol}$  und  $\beta$  in mg/l in  $\mu\text{M}$  umgerechnet worden.

(IX)

$$c = \frac{\beta}{M}$$



**Abb. 9: Pharmakokinetik von MWT-S-17 nach *p.o.* Applikation.** Wirkstoffkonzentration im Serum bis zu 8 h nach Applikation von 10 mg/kg. Dargestellt sind zwei Messungen, die sich durch die Dauer der Cholesterindiät (2 und 6 Wochen) unterscheiden. MW  $\pm$  SD, n = 3.



**Abb. 10: Pharmakokinetik von MWT-S-17 nach *i.v.* Applikation.** Wirkstoffkonzentration im Serum bis zu 8 h nach Applikation von 3 mg/kg. Dargestellt sind zwei Messungen, die sich durch die Dauer der Cholesterindiät (2 und 6 Wochen) unterscheiden. MW  $\pm$  SD, n = 3.

Die absolute Bioverfügbarkeit wurde im Institut für Pharmakologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald in der Abteilung für klinische Pharmakologie mithilfe der Daten der beiden Gruppen (*i.v./p.o.*) errechnet (vergleiche 9.5). Die Werte sind im Folgenden zusammenfassend dargestellt (siehe Tbl. 13).

**Tbl. 13:** Erhobene Daten aus PK1 und PK2 von MWT-S-17 und MWT-S-18 im Vergleich.

	MWT-S-17 PK 1	MWT-S-17 PK 2	MWT-S-18 PK 1	MWT-S-18 PK 2
$c_{\max}$ in ng/ml	1185 ± 203,7	1061 ± 938,9	106 ± 68,6	204 ± 188,2
$t_{\max}$ in h	0,52 ± 0,05	1,50 ± 1,32	0,49 ± 0,01	0,44 ± 0,22
AUC in (ng*h)/ml	1551 ± 136,7	2132 ± 1569,0	148 ± 59,0	239 ± 127,9
$t_{1/2}$ in h	1,187 ± 0,570	1,334 ± 0,391	1,157 ± 0,526	1,210 ± 0,097
F in %	70,24 ± 6,19	102,99 ± 75,8	6,00 ± 2,39	15,73 ± 8,41

$c_{\max}$ : Maximale Blut- bzw. Serumkonzentration

$t_{\max}$ : Zeitpunkt, zu dem  $C_{\max}$  erreicht wird

AUC: Fläche unter der Konzentration-Zeit-Kurve

$t_{1/2}$ : Halbwertszeit. Zeit in der die Konzentration um die Hälfte verringert wird

F: absolute Bioverfügbarkeit. Anteil des Wirkstoffes, der im systemischen Kreislauf zur Verfügung steht

#### 4.2.2 Vehikel- und Inhibitorselektion

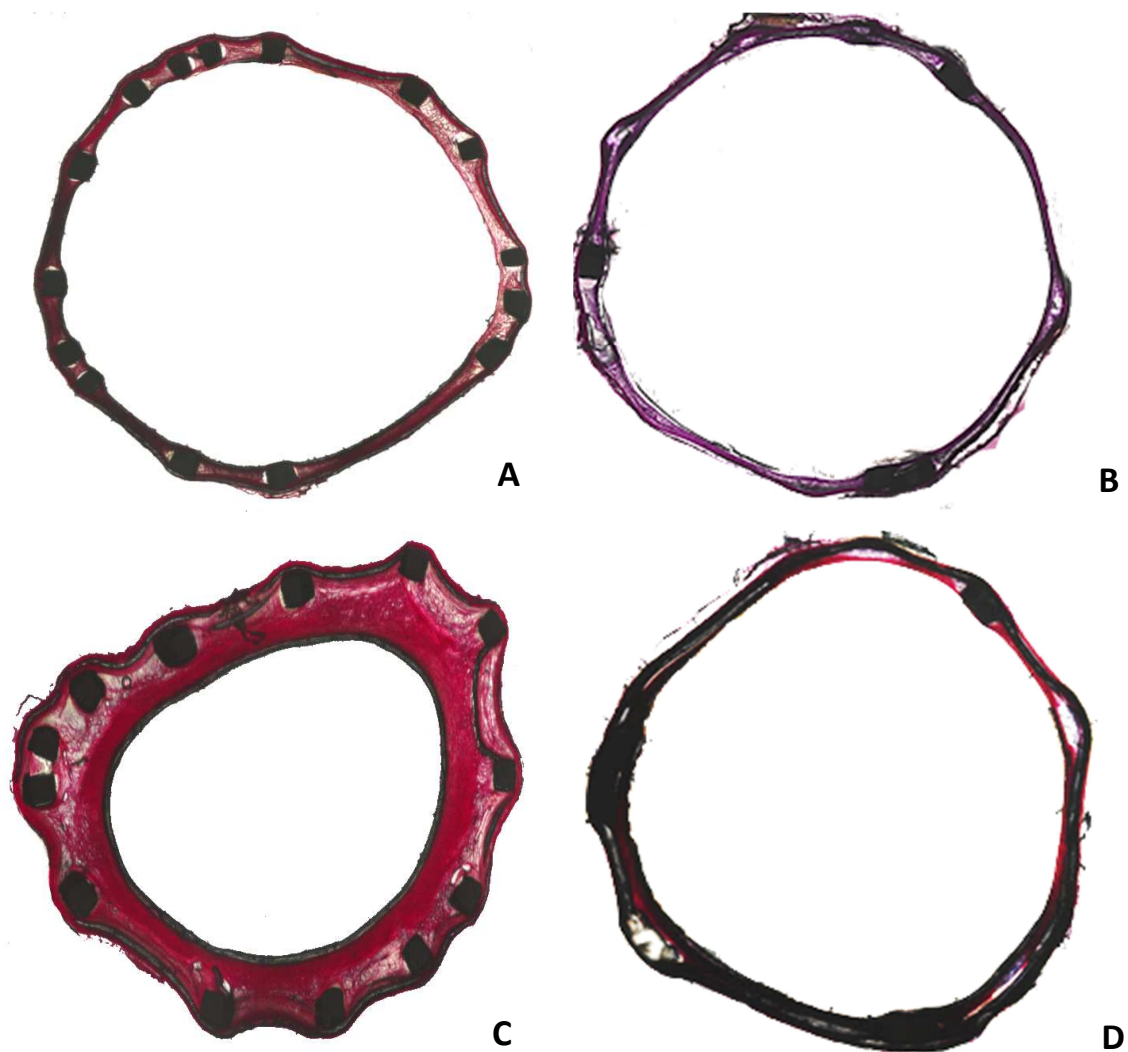
Aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten PK-Studien wurde als Substanz für den Behandlungsversuch MWT-S-17 ausgewählt, da dieses eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit (70 – 100 %) als MWT-S-18 (6 – 16 %) aufwies. Die Halbwertszeiten beider Substanzen waren ähnlich (Mittelwerte: 1,26 h und 1,18 h).

Die Auswahl der Dosis im Behandlungsversuch wurde von bereits durchgeführten Versuchen im Mausmodell extrapoliert (CYNIS et al. 2011). Die dort angegebene Tagesdosis betrug 600 mg/kg und wurde deshalb im Behandlungsversuch auf 1000 mg/kg und 330 mg/kg festgelegt. Diese Dosis wurde in drei oralen Gaben alle 8 h verabreicht.

Um den QC/isoQC-Inhibitor applizieren zu können, muss dieser in einer Lösung vorliegen, die bei Langzeitanwendung weder toxisch für das Tier sein darf, noch die Eigenschaften der Substanz beeinflusst. In reinem Natriumchlorid (NaCl), Citrat oder Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) war der Inhibitor auch nach Behandlung im Ultraschallbad nicht löslich, weshalb ein Lösungsmittel zugesetzt werden musste. Reines DMSO, bei dem die makroskopische Löslichkeitsgrenze nach 4 min Behandlung im Ultraschallbad bei 200 mg/ml lag, sollte nicht verwendet werden, um die potentiell auftretenden Nebenwirkungen zu vermeiden. Diese sind, nach SWANSON (1985), vor allem Hämolyse nach intravenöser Gabe sowie Störungen des Verdauungstraktes nach oraler Aufnahme. Außerdem kann DMSO in hohen Dosen über einen längeren Zeitraum hinweg bei Kaninchen zu Linsenschäden führen (JACOB et al. 1986). Da die Löslichkeitsgrenze von MWT-S-17 in DTP-10 14,75 mg/ml betrug, war es nicht möglich die nötige Dosis in ein applizierbares Volumen zu bringen, um sie den Tieren oral zu verabreichen. Deshalb wurde im Behandlungsversuch eine stabile Suspension mit 1 % HPMC hergestellt.

### 4.2.3 Modelletablierung

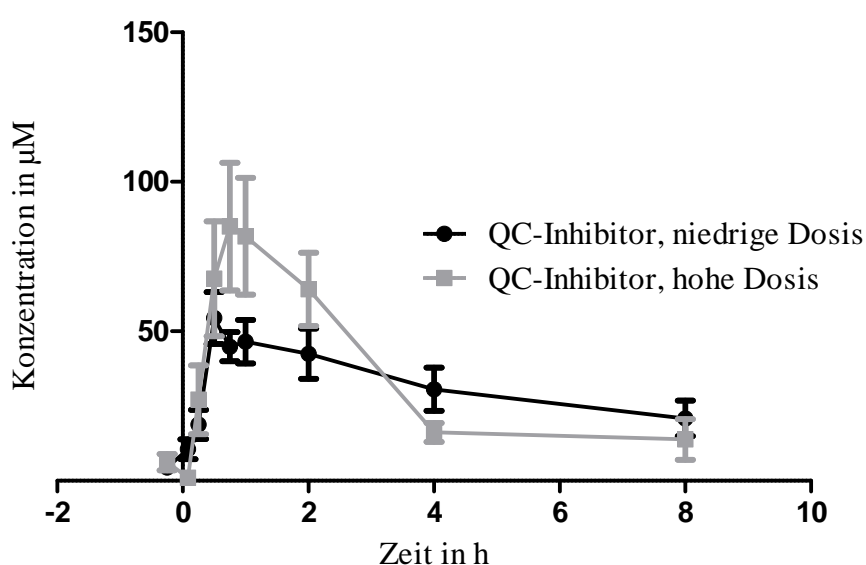
Die Etablierung der Operationsmethode hatte den Zweck, das Handling sowie die Technik der interventionellen, katheterbasierten Stentplatzierung (und deren histologische Bearbeitung) an den Tieren des Vorversuches zu erlernen. Außerdem wurde exemplarisch bei einigen Tieren der Einfluss einer Vorschädigung durch Denudation mittels Ballonkatheter im Seitenvergleich überprüft. Aufgrund der in Abbildung 11 dargestellten Ergebnisse wurde im Behandlungsversuch eine Vorschädigung des Arterienendothels durch Ballondilatation durchgeführt.



**Abb. 11: Exemplarischer Seitenvergleich der Neointimaproliferation nach Stentimplantation mit und ohne Endotheldenudation.** Das Ergebnis ist seitenvergleichend 2 und 4 Wochen nach Stentimplantation dargestellt. 40xfach vergrößert. A: linke Seite nach 2 Wochen mit Vorschädigung, Movat Pentachrom; B: Rechte Seite nach 2 Wochen ohne Vorschädigung, HE; C: Linke Seite nach 4 Wochen mit Vorschädigung, Movat Pentachrom; D: Rechte Seite nach 4 Wochen ohne Vorschädigung, Movat-Pentachrom.

#### 4.2.4 Wirkstoffprofil

Um zu überprüfen, ob die Wirkstoffkonzentration trotz geänderter Formulierung ausreichte, wurde im Versuch zwei Wochen nach Therapiebeginn zwischen zwei Behandlungsintervallen bei drei Tieren pro Gruppe exemplarisch Blut an verschiedenen Zeitpunkten entnommen und analysiert. Zur Feststellung, ob die Konzentration der Substanz im Blut ausreicht, um das Zielenzym zu hemmen, sollte diese mit dem gemessenen  $K_i$ -Wert (210,33 nM) verglichen werden. Bei einer Konzentration von  $10 \times K_i$  (2,  $\mu\text{M}$ ) ist in Lösung von einer vollständigen Enzymhemmung auszugehen (LILLY 2007).



**Abb. 12: Konzentration von MWT-S-17 im Serum nach oraler Applikation im 8 h Behandlungsintervall.** Niedrige Dosis: 110 mg/kg. Hohe Dosis: 330 mg/kg. MW  $\pm$  SD, n = 3.

Die InhibitorKonzentration in den mit hoher Dosis behandelten Tieren schwankt zwischen maximal 84,9  $\mu\text{M}$  und minimal 13,7  $\mu\text{M}$ . Bei den Tieren, welche die Substanz in niedriger Konzentration erhielten, liegen der Maximalwert bei 54,5  $\mu\text{M}$  und der Minimalwert bei 20,91  $\mu\text{M}$ .

Somit war der im Serum nachweisbare Wirkspiegel von MWT-S-17 auch während des Versuchs konstant über dem errechneten zehnfachen  $K_i$  von 2,1  $\mu\text{M}$ , der eine theoretische vollständige Hemmung des Enzyms in Lösung hervorruft.

## 4.3 Blutuntersuchungen

### 4.3.1 Kleine Blutbilder

Den Tieren wurde vor Versuchsbeginn nach einwöchiger Akklimatisierungsperiode (Alter: 14 Wochen), sowie vor Versuchsende (Alter: 22 - 24 Wochen) venöses Blut entnommen und im Blutgasanalysegerät scil Vet ABC analysiert. Im Folgenden sind die Mittelwerte tabellarisch im Vergleich zu den Kaninchen-Standardwerten laut Hersteller, sowie einem der Literatur entnommenen (SUCKOW et al. 2010) Laborreferenzwert dargestellt (Einzelmessungen unter 9.3). Die Abweichungen der gemessenen Mittelwerte wurden zum Literaturreferenzwert bestimmt. Es fällt auf, dass die Werte des Hämoglobins (HGB), des Hämatokrits (HCT) sowie der Erythrozyten (RBC) ca. 20 % über den Referenzwerten liegen. Außerdem sind im Mittel 5 % mehr Lymphozyten (LYM) im Blut vorhanden. Nach Stentimplantation und Cholesterindiät sind die Erythrozyten mit knapp 19 % unterhalb des Referenzwertes und damit um über 40 % zum physiologischen Gruppenvergleich gesunken. Der HCT reduzierte sich um knapp 10 %, was einer Differenz von ca. 30 % entspricht.

**Tbl. 14:** Mittelwerte der kleinen Blutbilder in Bezug auf unterschiedliche Referenzwerte.

	<b>WBC</b> 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	<b>RBC</b> 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	<b>HGB</b> g/dl	<b>HCT</b> %	<b>MCV</b> μm <sup>3</sup>	<b>MCH</b> pg	<b>MCHC</b> g/dl	<b>LYM</b> %	<b>MO</b> %	<b>GRA</b> %
A	7,3	8,3	18,7	54,8	69,6	23,2	33,3	71,5	1,9	26,6
B	5,2	4,3	10,0	30,6	71,8	23,5	32,6	68,9	2,0	29,1
C	6,3-10	5,2-6,8	11,5- 15,1	36-47	65-76	21,1- 24,5	29,5- 33,9	-	-	-
D	5,1-9,7	5,3-6,8	9,8- 14	34-43	60-69	20-23	31-35	39-68	1-9	25-46
E	0	<b>22,06</b>	<b>23,84</b>	<b>21,1</b>	0,87	0,87	0	<b>5,15</b>	0	0
F	0	<b>-18,87</b>	0	<b>-10</b>	4,05	2,17	0	1,32	0	0
G	0	<b>-40,93</b>	23,84	<b>-31,1</b>	3,18	1,3	0	-3,83	0	0

Positive Abweichungen >5 % sind **blau**, negative **rot** dargestellt

<sup>A</sup> Physiologische Werte: weibliche NZW, 14 Wochen alt, n = 28

<sup>B</sup> Versuchsende: 4 Wochen nach operativer Stentimplantation und 28 Tagen Cholesterindiät, n = 14

<sup>C</sup> Gerätereferenz: scil Vet ABC, Referenz für Kaninchen laut Hersteller

<sup>D</sup> Literaturreferenz nach SUCKOW et al. 2010

<sup>E</sup> prozentuale Abweichung der physiologischen Mittelwerte vom Literaturreferenzwert

<sup>F</sup> prozentuale Abweichung der versuchsspezifischen Mittelwerte vom Literaturreferenzwert

<sup>G</sup> Differenz der Mittelwerte vor und nach dem Versuch



WBC:	Leukozyten
RBC:	Erythrozyten
HGB:	Hämoglobin
HCT:	Hämatokrit
MCV:	Mittleres korpuskuläres Volumen
MCH:	mittlere korpuskuläre Hämoglobinmenge eines Erythrozyten
MCHC:	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
LYM:	Lymphocyten
MO:	Monozyten
GRA:	Granulozyten

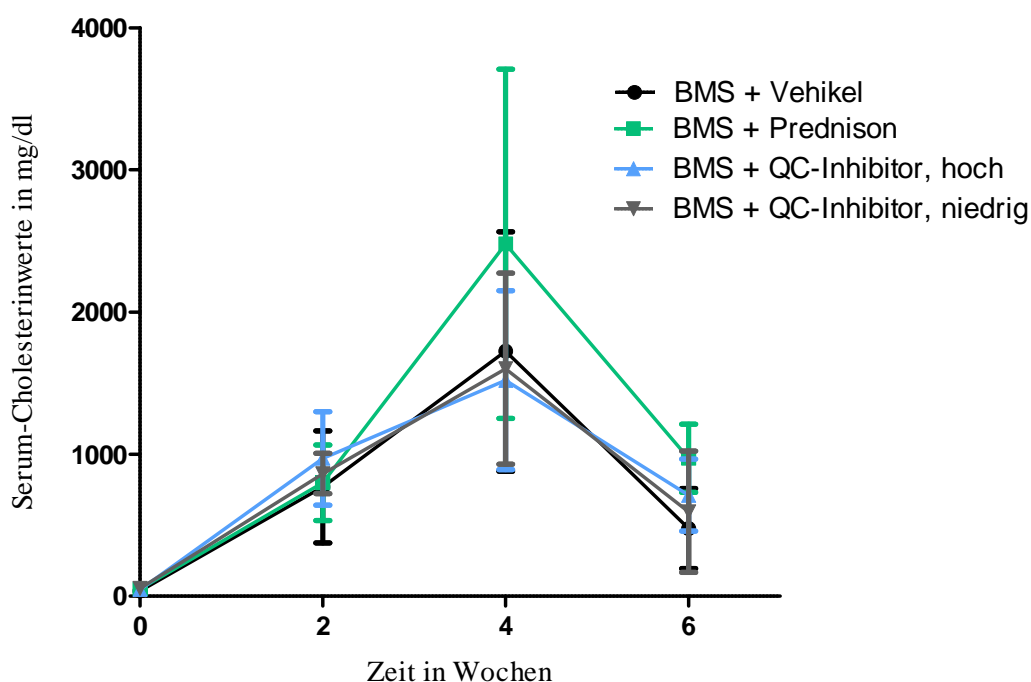
### 4.3.2 CCL2-Konzentration im Serum

Die frei in der Zirkulation vorhandene CCL2-Konzentration war mit dem hier verwendeten CCL2-1-ELISA (Cusabio) nicht messbar, da die Chemokin-Serumkonzentrationen unterhalb des detektierbaren Bereiches (Standardgerade) lagen.

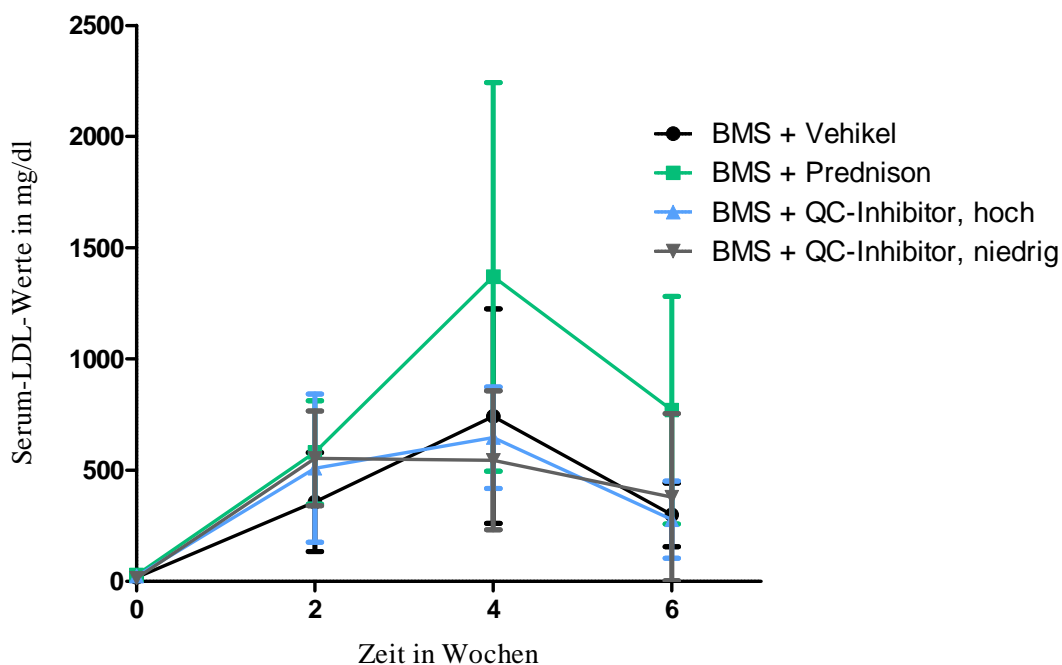
### 4.3.3 Serumcholesterin und LDL-Konzentration

Die anfangs physiologische Cholesterinkonzentration von 10-100 mg/dl (SUCKOW et al. 2010) im Serum der Tiere stieg nach Futterumstellung auf das 1 % Cholesterin und 4,8 % Fett enthaltende Spezialfutter über vier Wochen kontinuierlich an. Nach dem Wechsel auf das Standardfutter fielen die Werte wieder, erreichten aber in den verbleibenden zwei Versuchswochen nicht den physiologischen Ausgangswert. Der Kurvenverlauf der einzelnen Behandlungsgruppen ist ähnlich, die relativ hohen Konzentrationen in der Prednison behandelten Positivkontrolle sind durch einen Ausreißer bedingt (siehe Abb. 13).

Die Cholesterinwerte entsprechen den in der Literatur angegeben Werten (KHANNA et al. 2013): Nach 8 Wochen Fettdiät (1 % Cholesterin und 6 % Fett) werden Werte von ca. 1484 mg/dl angegeben. LDL ist dort mit ca 320,5 mg/dl beschrieben, was in etwa der Hälfte der in dieser Studie bestimmten maximalen LDL-Konzentration (ca. 600 mg/dl) im Blut entspricht (siehe Abb. 14).



**Abb. 13: Serumcholesterinwerte im Gruppenvergleich in Abhängigkeit vom Versuchszeitpunkt.** Vor Woche 0: Standardfutter. Woche 0-4: 1 % Cholesterinfutter. Woche 4-6: Standardfutter. MW  $\pm$  SD, n = 2-8.



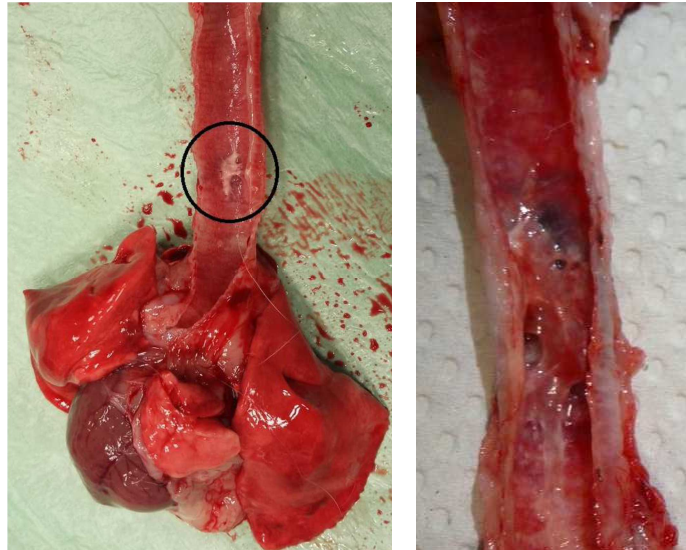
**Abb. 14: Serum-LDL Werte im Gruppenvergleich in Abhängigkeit vom Versuchszeitpunkt.** Vor Woche 0: Standardfutter. Woche 0-4: 1 % Cholesterinfutter. Woche 4-6: Standardfutter. MW  $\pm$  SD, n = 2-8.

## 4.4 Histopathologische Auswertung

### 4.4.1 Sektionen

Drei der 28 Tiere überlebten die Operation nicht. Ein Tier verstarb nach erfolgreicher Operation durch Herz-Kreislaufversagen und diente als „akute Kontrolle“, zwei weitere erlitten eine Carotisruptur durch das Einführen der Schleuse und mussten vor der Stentimplantation euthanasiert werden.

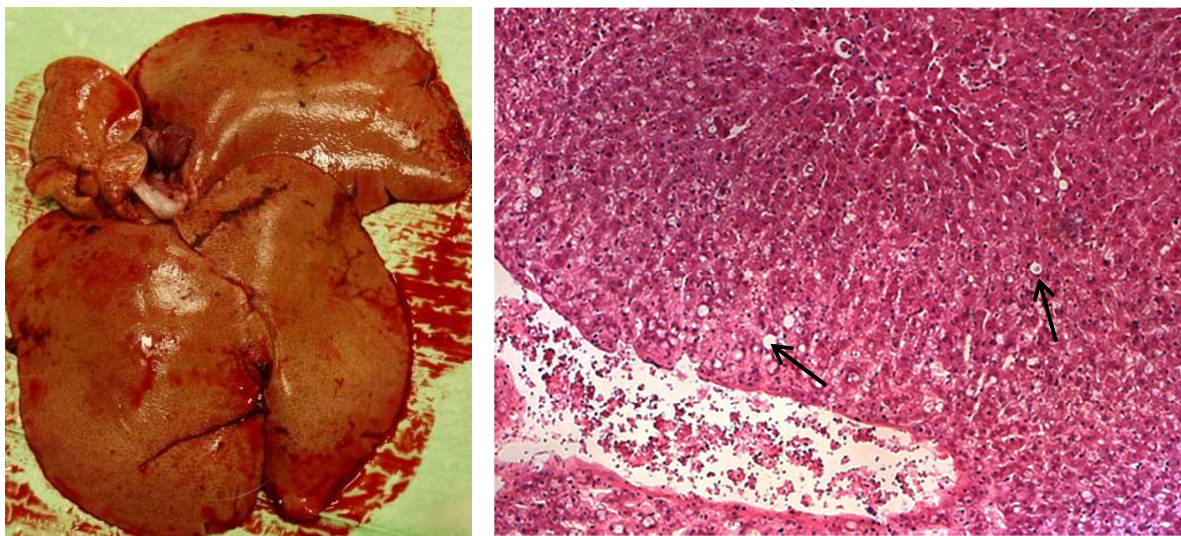
Von 25 in den Behandlungsversuch eingehenden Tieren erreichten 13 Kaninchen das reguläre Versuchsende nach 28 Behandlungstagen. Tiere die vorher aus dem Versuch genommen werden mussten, fielen klinisch durch Atembeschwerden auf. Ursächlich waren diese auf Trachealstenosen zurückzuführen, die wahrscheinlich durch die Intubation induziert waren. Histologisch stellte sich eine multifokale mittel- bis hochgradige, chronisch-aktive, oberflächlich nekrotisierende und ulzerative Tracheitis dar. Diese ging mit vollständigem Verlust des Oberflächenepithels sowie mit in der Tiefe hochgradiger Ausbildung fibroangioplastischer Granulationsgewebsstrukturen einher, die partiell das Lumen verlegten.



**Abb. 15: Hochgradige, chronisch-aktive, oberflächlich nekrotisierende und ulzerative Tracheitis mit partieller Lumenverlegung.**

Die Manifestation erstreckte sich gleichmäßig durch alle Behandlungsgruppen und die klinischen Symptome traten überwiegend 14 - 21 Tage nach der Operation auf. Die betroffenen Tiere wurden durchschnittlich neun Tage lang zusätzlich symptomatisch mit Salbutamol

(2 x tgl. 2 Sprühstöße mit 100 Mikrogramm), Budesonid (2 x tgl. 1 Sprühstoß mit 200 Mikrogramm) und Furosemid (2 x tgl. 3 mg *i.m.*) behandelt. Vier der behandelten Tiere erreichten das reguläre Versuchsende. Alle Tiere wurden im Anschluss an die Tötung im Fraunhofer IZI pathologisch-anatomisch untersucht. Die Kaninchen mit ausgeprägten Trachealstenosen wiesen mittel- bis hochgradige Rechtsherzdilatationen auf. Ein Tier verstarb aufgrund eines Abscheidungsthrombus, der im linken Atrium lokalisiert war. 100 % der Kaninchen hatten eine diffuse mittelgradige Leberverfettung durch die cholesterinhaltige Diät.

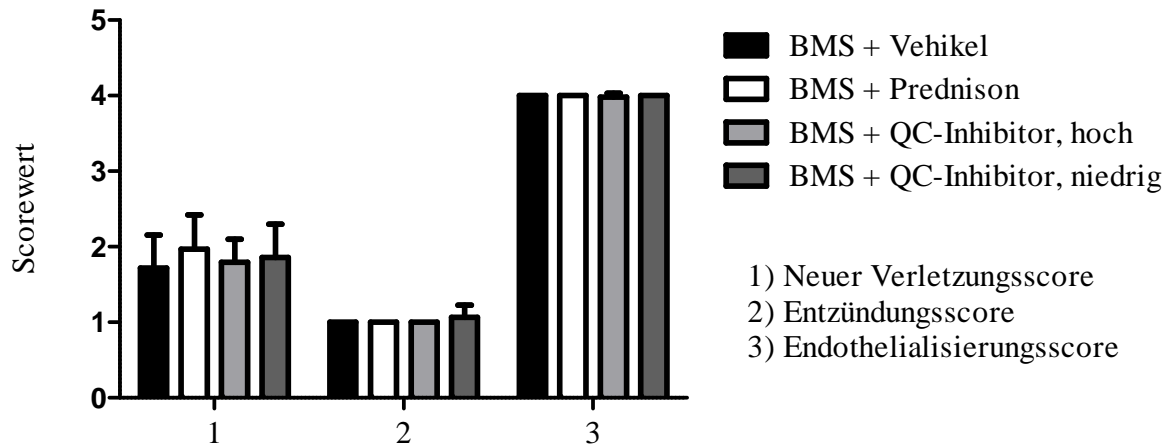


**Abb. 16: Mittelgradige Leberverfettung.** Links: Makroskopisches Bild einer Leberverfettung: Die Leberoberfläche ist ockerfarben und weist diffuse rötliche Verfärbungen auf. Rechts: Histologisches Bild einer Leberverfettung: Großtropfige Vakuolisierung der Hepatozyten (Pfeile). HE, 100xfach vergrößert.

## 4.4.2 Histologie

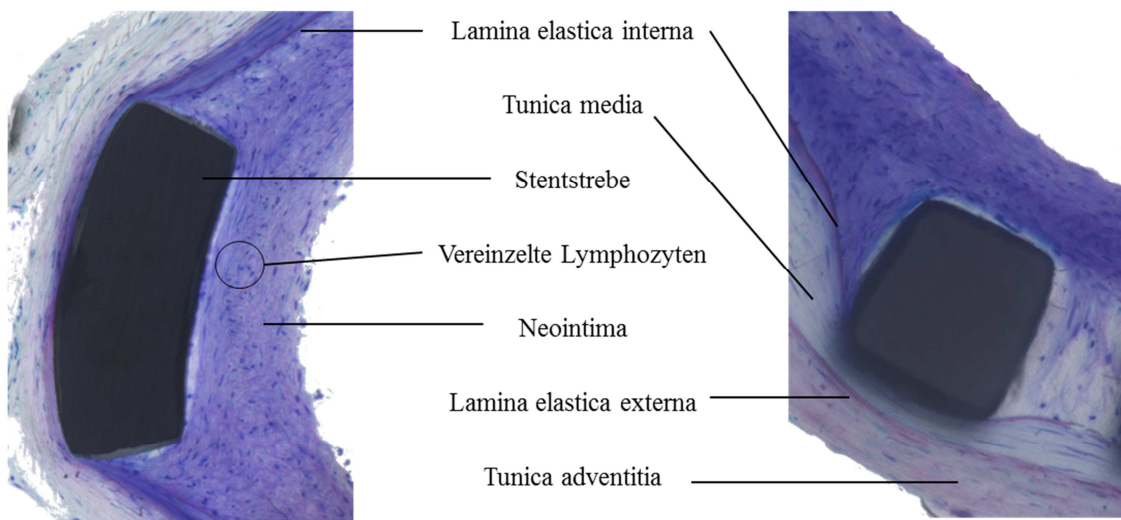
### 4.4.2.1 Entzündungsparameter

Bei der Auswertung der Giemsa-gefärbten Schliffe konnte mit Hilfe der drei Scores kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen ermittelt werden (siehe Abb. 17).



**Abb. 17: Mittelwerte der unterschiedlichen Entzündungsscores im Gruppenvergleich.** \* $p < 0,05$ , one-way ANOVA, Tukey post-hoc Test, 95 % Konfidenzintervalle, MW  $\pm$  SD, n = 4-8.

Alle Proben waren vollständig endothelialisiert, wiesen nur vereinzelt Entzündungszellen auf und die Mediadehnung und Deformation war meistens ohne Ruptur der *Lamina elastica interna* zu beobachten (siehe Abb. 18).

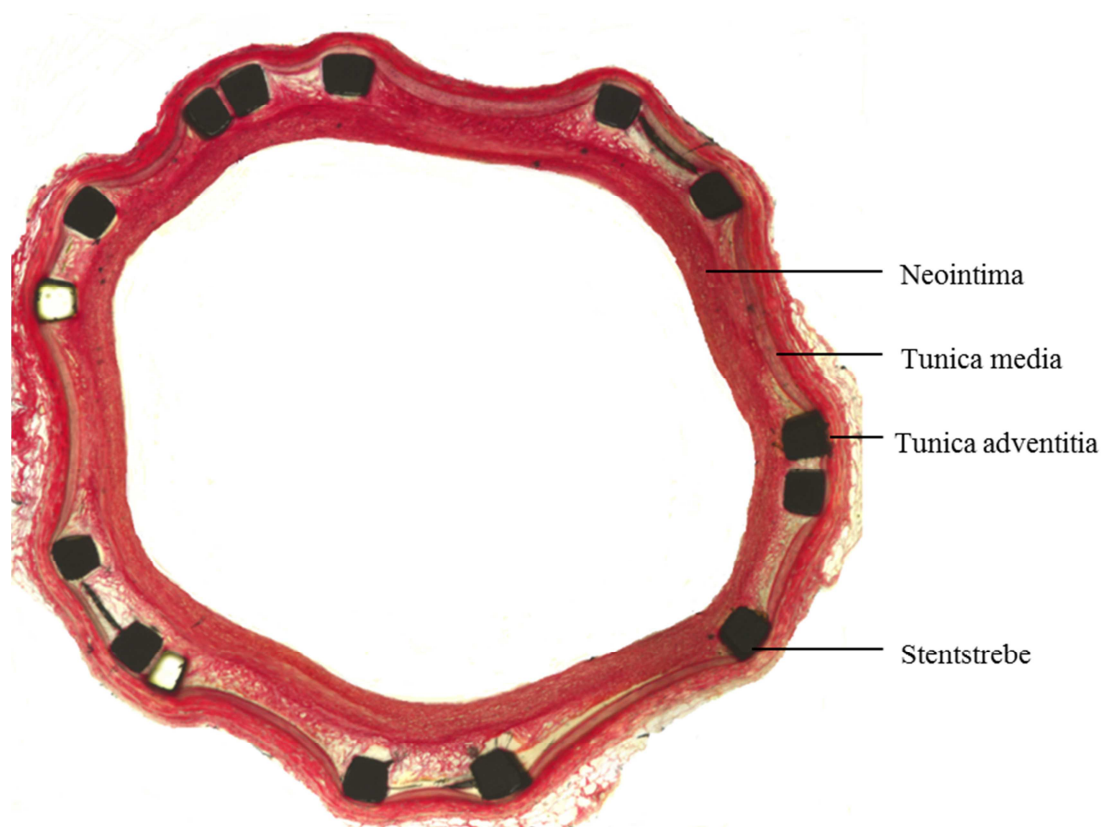


**Abb. 18: Ausschnitt eines gestenteten Gefäßes.** Giemsa, 200xfach vergrößert. *Lamina elastica interna* und *externa* intakt. Neuer Verletzungsscore = 2.



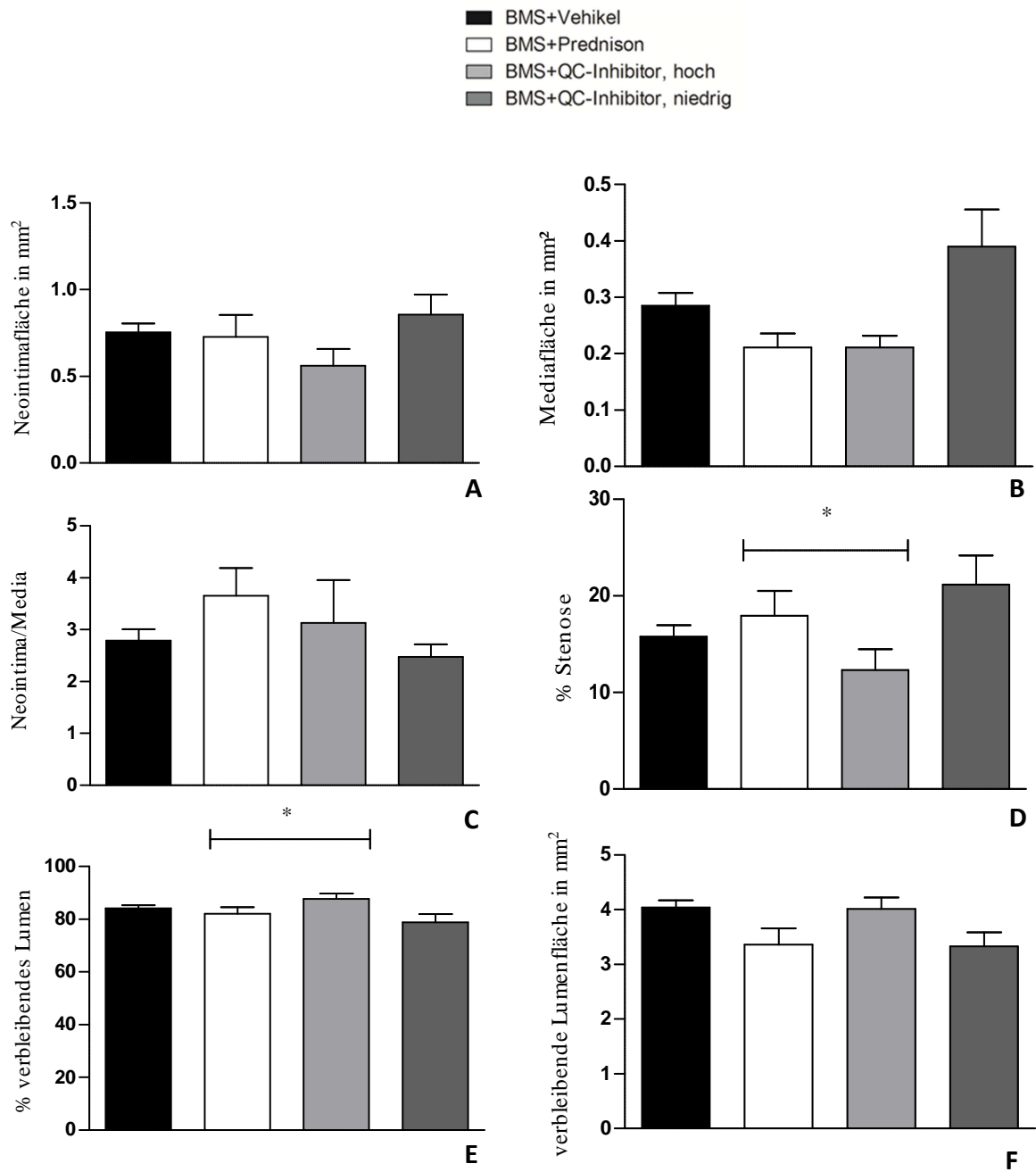
#### 4.4.2.2 Morphometrische histologische Untersuchung

Die Auswertung der Movat-Pentachrom gefärbten Schliffe (siehe Abb. 19) beinhaltete einzeln betrachtete Parameter wie Neointimafläche, Fläche des verbleibenden Lumens sowie Mediafläche. Aufeinander bezogene Werte waren % verbleibenden Lumens, % Stenose, und Neointima/Media.



**Abb. 19: Histologische Probe der Gruppe BMS + QC-Inhibitor, niedrig.** Movat-Pentachrom, 40xfach vergrößert.

Die Neointimafläche weist keine Unterschiede zwischen beiden Kontrollgruppen auf (siehe Abb. 20 A). Die Neointimabildung in der Behandlungsgruppe mit hoher QC/isoQC-Inhibitor dosis ist im Vergleich zur Kontrolle geringer, die in der Behandlungsgruppe mit niedriger QC/isoQC-Inhibitor dosis größer. Es handelt sich allerdings nur um einen Trend, da die statistische Signifikanz fehlt. Der einzige statistisch belegbare Behandlungserfolg ist bei dem Parameter % Stenose (Abb. 20 D) und somit auch bei % des verbliebenen Lumens (Abb. 20 E) zwischen der Positivkontrolle und der QC/isoQC-Behandlungsgruppe mit der hohen Dosis zu sehen (Konfidenzintervall 0,07 - 17,54).



**Abb. 20: Bei der Morphometrie erhobene Parameter im Gruppenvergleich.** A: Neointimafläche in mm<sup>2</sup>; B: Mediafläche in mm<sup>2</sup>; C: Neointimafläche/Mediafläche; D: % Stenose; E: % verbleibendes Lumen; F: Fläche des verbleibenden Lumens in mm<sup>2</sup>. \*p < 0,05, one-way ANOVA, Tukey post-hoc Test, 95 % Konfidenzintervalle, MW ± SD, n = 4-8.

## 4.5 Biochemische Untersuchungen *ex vivo*

### 4.5.1 Kalibriergerade

Die Flächen der Extinktionspeaks von pGlu-βNA wurden gemittelt und gegen die Konzentration aufgetragen (Abb. 21). Mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9996 wies die Kalibriergerade eine hohe Qualität auf. Nach Formel (X) ergab sich folgende Geradengleichung:

(X)

$$y = 14442 x + 3794,3$$

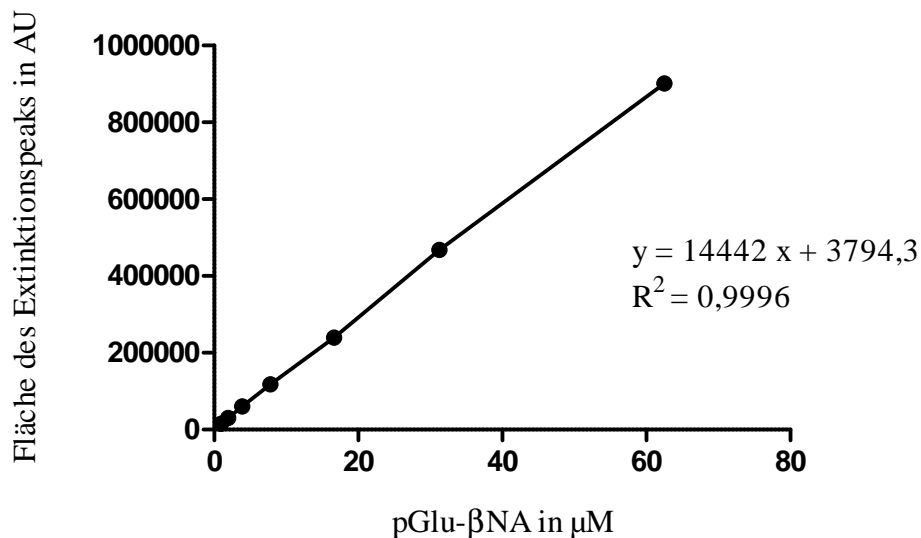
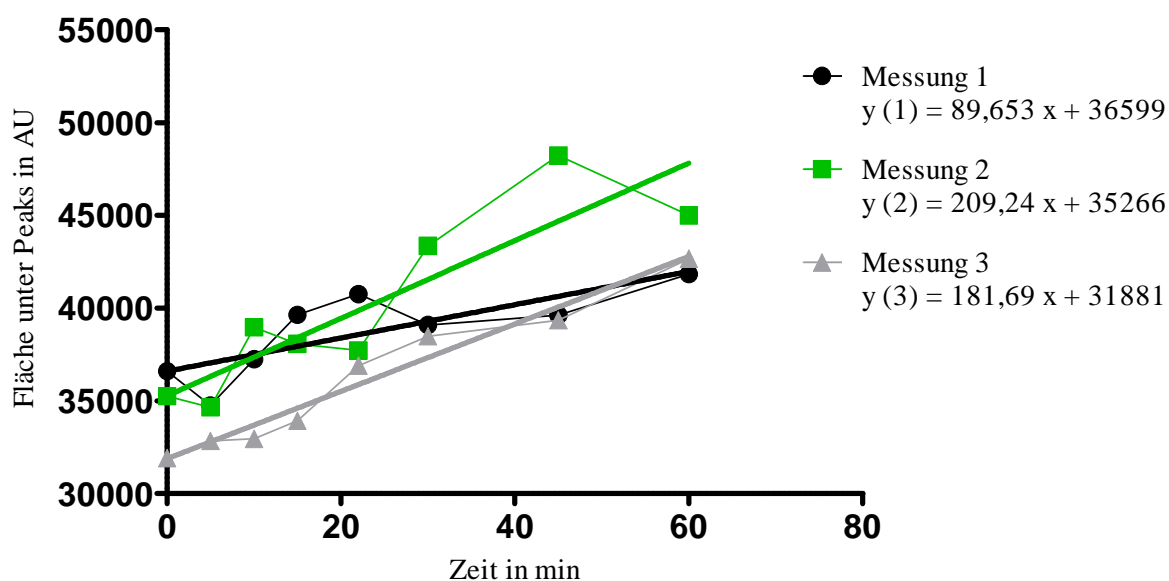


Abb. 21: Kalibriergerade zur Quantifizierung von pGlu-βNA mittels HPLC.

### 4.5.2 Berechnung der spezifischen QC-Aktivität

Die Aufschlüsse der distalen Drittel der *Aa. ilicae externae* wurden in den entsprechenden Behandlungsgruppen dreimal mit Substrat inkubiert und die Extinktion von pGlu-βNA in der HPLC gemessen. Anschließend wurden die Flächen der Extinktionpeaks in Abhängigkeit von der Reaktionszeit in min aufgetragen und aus den Messpunkten eine lineare Regressionsgerade berechnet. Das Diagramm der Gefäßabschnitte aus der Prednison-Gruppe ist im Folgenden beispielhaft für alle Behandlungsgruppen dargestellt worden (Abb. 22).





**Abb. 22: Bestimmung der linearen Regressionsgeraden der Prednison behandelten Tiere.** Die Extinktionsflächen wurden in Abhängigkeit von der Reaktionszeit aufgetragen.

Zur Berechnung der spezifischen QC-Aktivität wurde für die jeweilige Behandlungsgruppe die Steigung der Kalibriergeraden mit einbezogen. Nach Transformation der Einheiten (von  $\mu\text{M}$  in  $\text{nM}$ ) ergab sich folgende Geradengleichung:

(XI)

$$y = 14,442x + 3794,3 \quad \text{mit} \quad [\text{m}] = \frac{\text{A}}{\text{nM}}$$

Die spezifische Aktivität berechnete sich nach Formel (XII). Alle Daten sind unter 9.6.3 zu finden.

(XII)

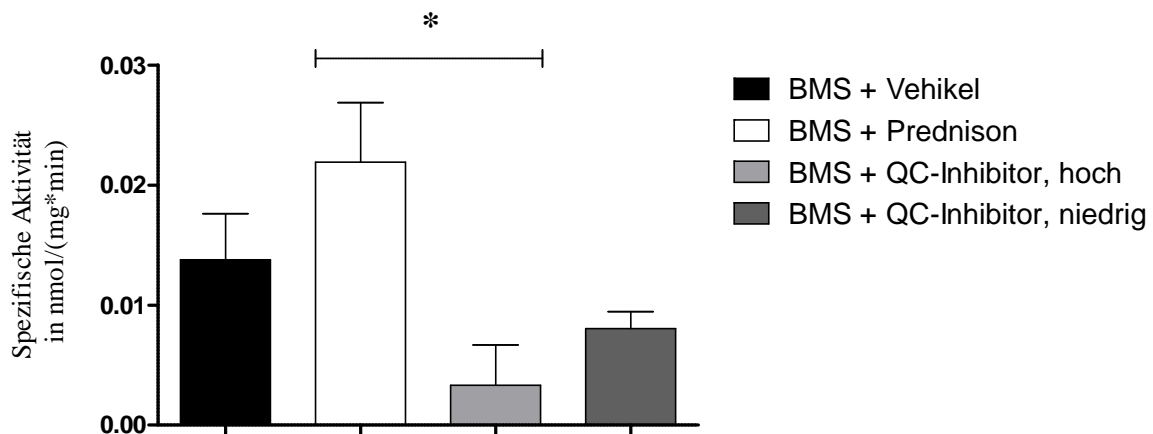
$$\text{Spezifische Aktivität} \frac{\text{nM}}{\text{min}} = \frac{\text{Steigung der Probe} \frac{\text{A}}{\text{min}}}{\text{Steigung der Kalibriergeraden} \frac{\text{A}}{\text{nM}}}$$

### 4.5.3 Vergleich der spezifischen QC-Aktivität

Um die QC-Aktivitäten mit Literaturergebnissen vergleichen zu können, wurde die Einheit wie in Formel (XIII) angegeben von nM/min in nmol/(mg\*min) umgerechnet. Dazu wurde die Konzentration der aufgeschlossenen Arterien im Inkubationsansatz mit Gln-βNA und N-Ethylmaleimid berücksichtigt (siehe 9.6.2).

(XIII)

$$\text{Spezifische Aktivität} \frac{\text{nmol}}{(\text{mg} * \text{min})} = \frac{\text{spezifische Aktivität} \frac{\text{nM}}{\text{min}}}{C \text{ Aufschlussfraktion im Ansatz} \frac{\text{mg}}{\text{ml}}}$$

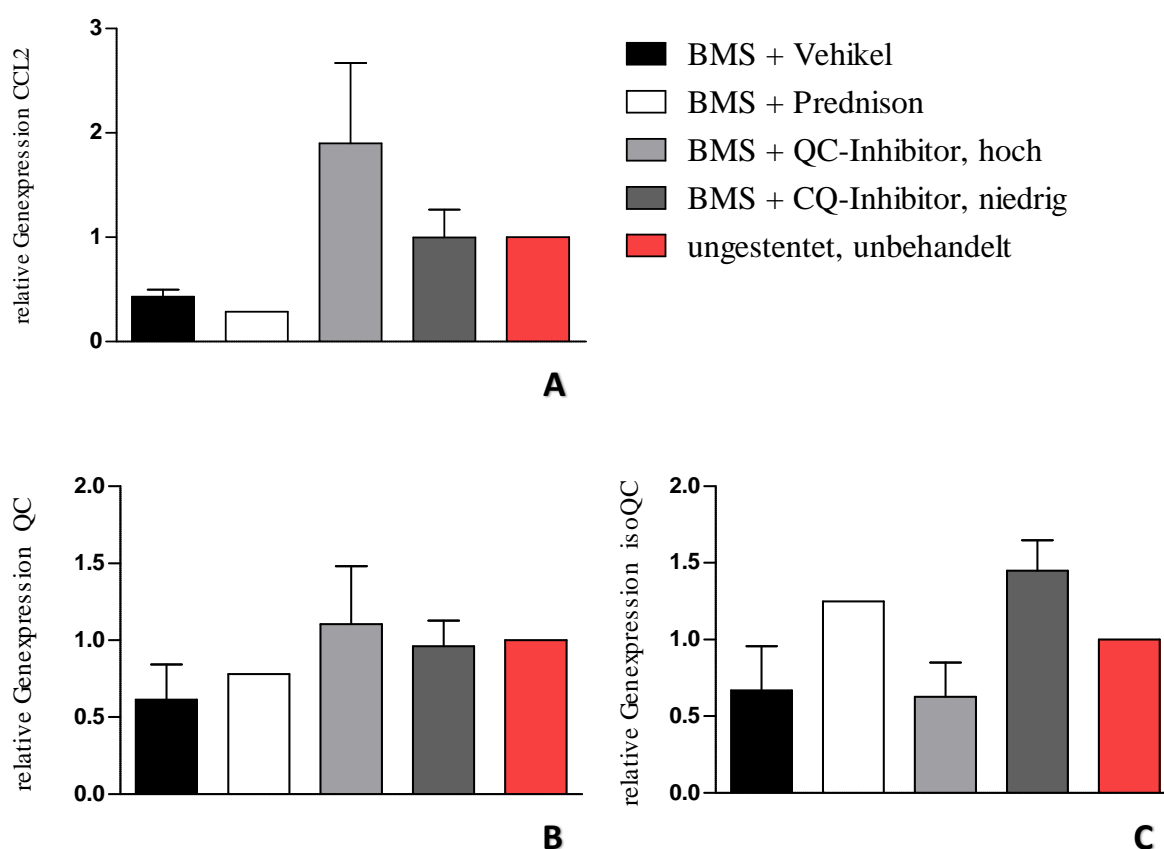


**Abb. 23: Spezifische QC-Aktivität im distalen Gefäßabschnitt in Abhängigkeit von der Behandlung.** \*p < 0,05, one-way ANOVA, Tukey post-hoc Test, MW ± SD, n = 2-4.

#### 4.5.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Die Darstellung der Referenz- und normierten Zielgene der qRT-PCR, nach Formel (VIII) berechnet, befindet sich im Anhang 9.6.3 (Tbl. 29). Im Folgenden ist für jedes Zielgen (rCCL2, rQPCT, rQPCTL) die relative Genexpression separat im Säulendiagramm aufgetragen worden. Aufgrund der unterschiedlichen Gruppenzusammensetzung konnten die Daten nicht statistisch ausgewertet werden.

Bei CCL2 fällt auf, dass die Expression in der hoch dosierten Inhibitorgruppe fast doppelt so hoch ist wie in der unbehandelten sowie der niedriger dosierten Inhibitorgruppe (siehe Abb. 24 A). Bei der relativen Genexpression von QC und isoQC ließen sich gruppenvergleichend kaum Unterschiede darstellen (siehe Abb. 24 B und C).



**Abb. 24: Relative Genexpression von CCL2, QC und isoQC in Abhängigkeit der Behandlungsgruppe, normiert auf eine Probe eines ungestenteten, unbehandelten Tieres.** A: Relative Genexpression von CCL2; B: Relative Genexpression der QC; C: Relative Genexpression der isoQC. MW  $\pm$  SD, n = 1-4.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Glutaminylzyklasen als Zielenzyme in der Wirkstoffforschung

Das primäre Ziel der vorliegenden Promotionsschrift war es, den Einfluss eines QC/isoQC-Inhibitors nach Stentimplantation im atherosklerotischen Kaninchenmodell zu untersuchen. Diese verringern *in vitro* die pGlu-Bildung am N-terminus des Zytokins CCL2, wodurch es metabolisch instabil und anfällig für Proteolyse wird (CYNIS et al. 2011). Des Weiteren wird die chemotaktische Potenz von CCL2 durch Verlust des N-terminalen pGlu-Restes herabgesetzt, was zu einer reduzierten Monozyteninvasion in das Gefäßendothel führt (PROOST et al. 1998). Der durchgeführte Tierversuch diente der Abschätzung, ob es durch die orale Behandlung mit MWT-S-17 zu einer Reduktion der ISR in gestenteten Gefäßen kommt.

Es wurden zwei potentielle QC/isoQC-Inhibitoren *in vitro* charakterisiert und pharmakokinetisch im Kaninchenmodell verglichen. Die anschließend ausgewählte Verbindung hat bereits im Mausmodell der manschetteninduzierten beschleunigten Atherosklerose einen Therapieeffekt bei oraler Behandlung gezeigt. Durch die Unterdrückung der Monozytenrekrutierung in die Gefäßwandzellen wurde eine klinisch und pathologisch abgeschwächte Atherosklerose mit reduzierter intimaler Hyperplasie sowie eine signifikant reduzierte Lumenstenose beobachtet (CYNIS et al. 2011).

In Bezug auf die konkreten Ziele dieser Dissertation konnten folgende Beobachtungen aufgestellt werden:

- Nach Vergleich der Bioverfügbarkeit beider Inhibitoren MWT-S-17 und MWT-S-18, konnte für ersteren eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit festgestellt werden.
- Die operative Etablierung eines in der Literatur beschriebenen ISR Models im atherosklerotischen Kaninchen ist realisierbar. Unter vierwöchiger 1 % iger Cholesterindiät und nach unmittelbar vor Stentimplantation erfolgter Endotheldenudation durch Ballondilatation ist histologisch eine Neointimabildung nachweisbar, die allerdings einer hohen Varianz unterliegt.

- Die histologische Auswertung des Behandlungsversuches ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der untersuchten Entzündungsparameter. Die morphometrische Analyse zeigte bezüglich der prozentualen Stenose eine Differenz zwischen Positivkontrolle und der Gruppe, welche mit der hohen Inhibitor-dosis behandelt wurde.
- Hinweise, dass ein oral verfügbarer, nicht selektiver QC/isoQC-Inhibitor die ISR hemmen könnte, werden durch einen positiven Trend bestätigt. Des Weiteren zeigen biochemische *ex vivo* Untersuchungen positive Ergebnisse bezüglich des therapeutischen Effektes auf.
- Es wird eine Wiederholung des Versuchs mit einem weiteren QC/isoQC-Inhibitor mit vorteilhafteren pharmakologischen Eigenschaften zur Konzeptvalidierung empfohlen.

## 5.2 Unterschiedliche ISR Kaninchenmodelle in der Literatur

Die das Kaninchenmodell beschreibende Literatur ist relativ heterogen in Bezug auf Zusammensetzung des Futters, den Ort des Zugangs bzw. der Stentimplantation sowie den Versuchsaufbau, obgleich es sich um ein Standardmodell in der Restenoseforschung handelt.

Häufig wird der arterielle Zugang über die *A. carotis communis* gelegt und dann die Aorta oder *Aa. iliacae externae* zur Implantation verwendet (MALLE 2013, CHE et al. 2016). Möglich ist auch, dass eine Schleuse in die *A. femoralis* gelegt wird, um von dort aus die Aorta zu erreichen (XIE et al. 2015). In manchen Experimenten wird der Stent auch durch den perkutanen Gefäßzugang der *A. femoralis* in die selbige implantiert (WU et al. 2015), oder eine Laparotomie durchgeführt, bei der die Aorta punktiert wird und die infrarenale *A. abdominalis* das Ziel ist (TEPE et al. 1998).

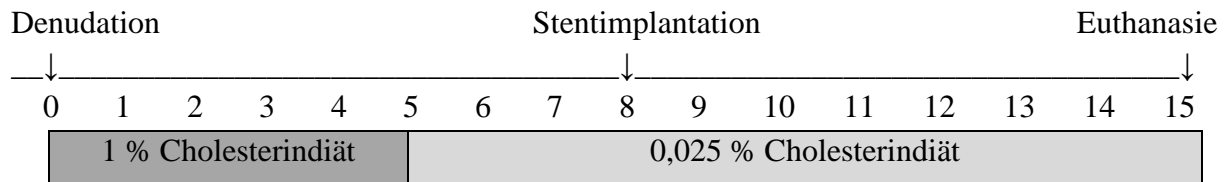
In der Literatur ist mehrfach beschrieben, dass sich im Kaninchenmodell eine Plaque oder Restenose durch Endotheldenudation in Kombination mit Cholesterindiät induzieren lässt. TEPE et al. (1998) verglichen Methoden zur Induktion einer Gefäßverengung mithilfe folgender Versuchsgruppen: Ballondilatation mit 0,5 % Cholesterinfutter, Ballondilatation mit normalem Futter, nur cholesterinhaltiges Futter und Tiere mit Stent und Normalfutter. Bei der Kombination aus Endothelschädigung und Cholesterindiät wurden die höchsten Stenosegrade von über 61 %, sowie bis zu 3 mm<sup>2</sup> Neointimafläche gemessen. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint es sinnvoll, die Endotheldenudation mit der alimentären Atheroskleroseinduktion zu kombinieren, um eine Plaquentstehung auszulösen.

Diätdauer und Zusammensetzung variieren von 0,025 % Cholesterin über 10 Wochen (MALLE 2013), 0,5 % Cholesterin über 16 Wochen (GRUNDGEIGER 2008), 1 % Cholesterin und 6 % Palmöl für 8 Wochen (FERRER et al. 2010) bis hin zu 5 % Cholesterin und 10 % Fett für 6 Wochen (LANGHEINRICH et al. 2005).

Im Folgenden sind drei unterschiedliche Modellvariationen ihrem Aufbau entsprechend exemplarisch dargestellt, die in der Literatur vorherrschend sind.

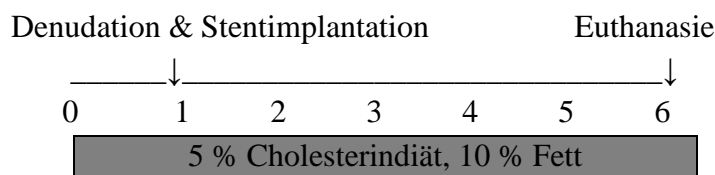
Stentimplantation nach atherosklerotischer Plaqueinduktion: Bei RIBICHINI et al. (2007) und MALLE (2013) findet die Plaqueinduktion in einer separaten Operation durch mechanische Endotheldenudation mit Hilfe eines Ballonkatheters statt. Beginnend eine Woche vor dem Eingriff wird für insgesamt 5 Wochen eine 1 % cholesterinhaltige Diät gefüttert (siehe Abb. 25). Anschließend wird die Ernährung auf ein geringer konzentriertes Cholesterinfutter

(0,025 %) umgestellt. Die eigentliche Stentplatzierung wird 2 Monate nach dem operativen Eingriff an der Stelle durchgeführt, an der sich durch die Vorschädigung eine Plaque gebildet hat. Nach 6 Wochen Stenteinwuchs kann die ISR untersucht werden.



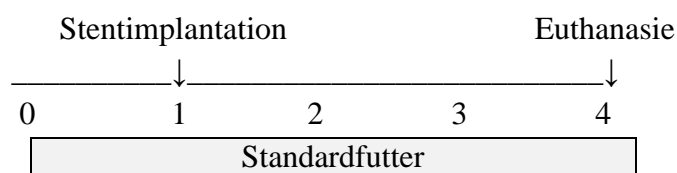
**Abb. 25: Versuchsaufbau in Wochen nach RIBICHINI et al. (2007) und MALLE (2013).**

Stentimplantation nach Endotheldenudation unter Cholesterindiät: Das ISR Modell lässt sich laut LANGHEINRICH et al. (2005), in einer einzigen Operation realisieren. Die Endothelschädigung durch den Ballonkatheter findet unmittelbar vor der Stentimplantation statt. Anschließend bekommen die Tiere bis zum Versuchsende cholesterin- und fettreiches Futter (siehe Abb. 26).



**Abb. 26: Versuchsaufbau in Wochen nach LANGHEINRICH et al. (2005).**

Stentimplantation in das gesunde Gefäß ohne Vorschädigung: 2016 veröffentlichten CHE et al. und HAN et al. die Untersuchung der ISR in gesunden Kaninchenarterien 4 Wochen nach der Stentimplantation (Abb. 27).



**Abb. 27: Versuchsaufbau in Wochen nach CHE et al. (2016) und HAN et al. (2016).**

### 5.3 Inhibitorauswahl

MWT-S-17 ist ein kompetitiver, nicht selektiver QC/isoQC-Inhibitor, der für die Anwendung im Menschen und somit für die Inhibition humaner Enzyme entwickelt wurde. Es lassen sich jedoch einige Hinweise dafür vorbringen, dass die im Menschen gezeigte Wirkungsweise auf andere Säugetiere übertragen werden kann und somit auch eine Verwendung im Kaninchen plausibel erscheint.

Sequenzidentität: Vergleicht man die Struktur der Aminosäuren der humanen (hQC und hisoQC), murinen (mQC und misoQC) und rQC und risoQCs, sind diese einander sehr ähnlich (KOCH et al. 2012). Die drei QCs weisen eine Sequenzidentität von ca. 77-88 % auf. Die Aminosäuren der isoQCs sind zu 74,6-90 % identisch (siehe Tbl. 15). Beide Kaninchenenzyme weisen weniger Unterschiede zu dem menschlichen Analogon als zu denen der Maus auf.

**Tbl. 15:** Interspezifischer Vergleich der Sequenzidentitäten von QC/isoQC in %.

Enzym	hQC	mQC	rQC	hisoQC	misoQC	risoQC
<b>hQC</b>		<b>86,2</b>	<b>79,9</b>	50,6	42,7	43,3
<b>mQC</b>	<b>85,7</b>		<b>76,9</b>	50,9	42,9	44,1
<b>rQC</b>	<b>88,1</b>	<b>85,3</b>		49,7	42,9	43,9
<b>hisoQC</b>	50,8	51,4	45,2		<b>74,6</b>	<b>77,5</b>
<b>misoQC</b>	49,5	50,2	45,2	<b>86,4</b>		<b>83,6</b>
<b>risoQC</b>	50,5	51,7	46,3	<b>90,0</b>	<b>83,8</b>	

**rot:** interspezifische Sequenzidentität der QCs: hQC, mQC und rQC

**blau:** interspezifische Sequenzidentität von hisoQC, misoQC und risoQC

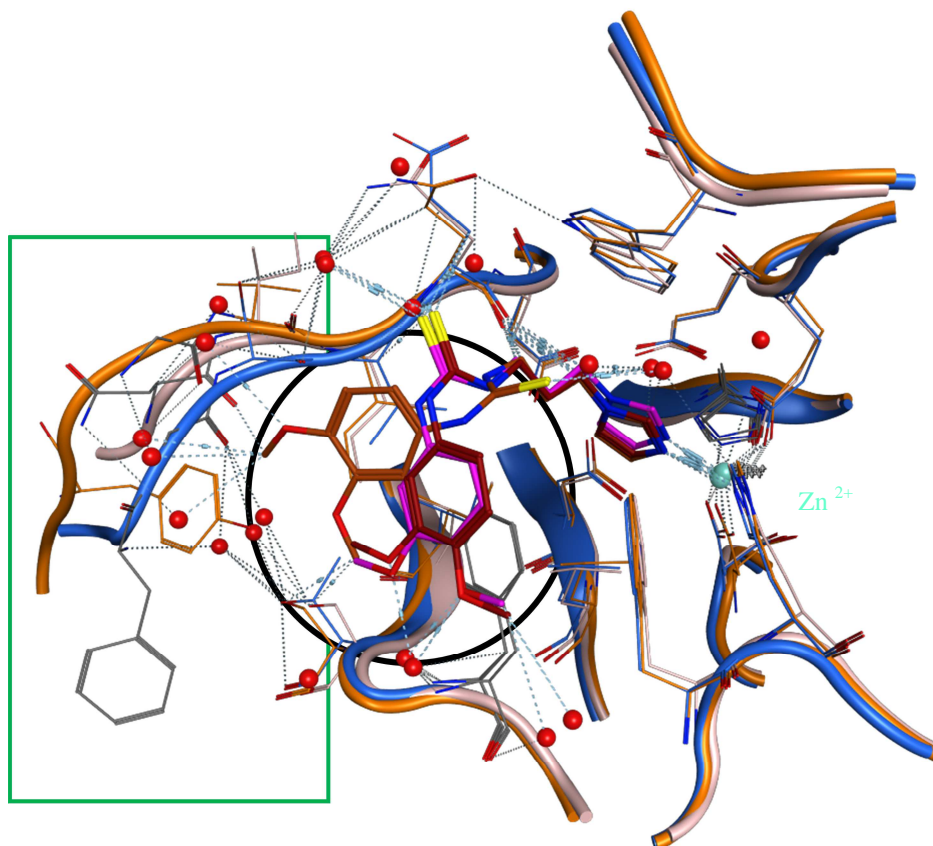
Strukturhomologie: Vor allem bei Betrachtung der für die Bindungen von MWT-S-17 relevanten Aminosäuren (siehe türkisfarbene Unterlegung in Abb. 28) fällt die speziesübergreifende Homologie der Enzyme auf. Insgesamt wurden 18 Aminosäuren als relevant für die Bindung des Inhibitors MWT-S-17 identifiziert. Sechs davon weisen im interspezifischen Vergleich zur hQC Unterschiede auf, drei davon betreffen in allen drei Spezies den gleichen Aminosäureaustausch von QC zu isoQC. Die Aminosäuren, die zum aktiven Zentrum gehören, sind also hoch konserviert.



1	GYRSFSNIISTLNPTAKRHLVLACHYDSKYFSHWNNRVFVGATDSAVP	120	125	130	135	140	145	150	155	160	
2	GYRSFSNIISTLNPEAKRHLVLACHYDSKYFPRWDSRVFVGATDSAVP	120	125	130	135	140	145	150	155	160	
3	GIRSFNSIISTLNPSTKRHLVLACHYDSKYFPRWDNRVVGATDSAVP	120	125	130	135	140	145	150	155	160	
4	GPVDFGNVVATLDPRAARHLTLACHYDSKLFPP·GSTPFVGATDSAVP	145	150	155	160	165	170	175	180	185	190
5	GPLDFGNVVATLDPGAARHLTLACHYDSKFFPP·GLPPFVGATDSAVP	145	150	155	160	165	170	175	180	185	190
6	GPLDFGNVVATLDPGAARHLTLACHYDSKFFPP·GSAPFVGATDSAVP	145	150	155	160	165	170	175	180	185	190
1	CAMMLELARALDKKLLSLKTVSDSKPDLSSLQLIFFDGEAAFLHWSPQD	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210
2	CAMMLELARALDKKLHSLKDVSGSKPDLSSLQLIFFDGEAAFLHWSPQD	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210
3	CAMMLELARALDKQLLSLKNVSDSRTAVSLQLIFFDGEAAFLHWSPQD	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210
4	CALLLELAQALDLELSRAKKQA· · ·APVTLQLLFLDGEAAFLHWSPQD	195	200	205	210	215	220	225	230	235	240
5	CALLLELVQALDAMLSRIKQQA· · ·APVTLQLLFL·GEEAAFLHWSPQD	195	200	205	210	215	220	225	230	235	240
6	CALLLELAQALDLELSRAKEQA· · ·APVTLQLLFLDGEAAFLHWSPQD	195	200	205	210	215	220	225	230	235	240
1	SLYGSRHLLAAKMASTPHPPGARGTSQLHGMDLLVLLDLIGAPNPTFPN	215	220	225	230	235	240	245	250	255	260
2	SLYGSRHLLAQKMASSPHPPGSRGTNQLDGMDDLVLVLLDLIGAANPTFPN	215	220	225	230	235	240	245	250	255	260
3	SLYGSRHLLASKMASTPHPPGARGTNQLHGMDLLVLLDLIGASNPTFPN	215	220	225	230	235	240	245	250	255	260
4	SLYGSRHLLAQLMESIPHSPG· · ·PTRIQAIELFVLLDLIGAPNPTFYS	240	245	250	255	260	265	270	275	280	285
5	SLYGSRHLLAQIMESIPHSPG· · ·PTRIQAIELFVLLDLIGASSPIFFS	240	245	250	255	260	265	270	275	280	285
6	SLYGSRHLLARLMESMPHSPG· · ·PTRIQAIELFVLLDLIGAPNPTFYS	240	245	250	255	260	265	270	275	280	285
1	FFPNSARWFERLQAI EHELHELGLLKDHSLEGRYFQNYSYGGV IQDDH	260	265	270	275	280	285	290	295	300	305
2	FFPKTTRWFNRLQAI EKELYELGLLKDHSLEKRYFQNFQYGN I IQDDH	260	265	270	275	280	285	290	295	300	305
3	FFSNTARWFNRFKAI EQELHELGLLKDHSLEKRYFQNFQYGG I IQDDH	260	265	270	275	280	285	290	295	300	305
4	HFPRTVRWFHRLRSI EKRLHRLNLLQSHPEVVMYFQPGEPFGSVEDDH	285	290	295	300	305	310	315	320	325	330
5	HFPRTARWFQRLRSI EKRLHRLNLLQSHPEVVMYFQPGEPGPGVEDDH	285	290	295	300	305	310	315	320	325	330
6	HFPRTIRWFHRLRSI EKRLHRLNLLQSHPEEVMYFQPGEPGPGSVEDDH	285	290	295	300	305	310	315	320	325	330
1	IPFLRRGVPVLHL I PSPFPEVWH TMDNEENLDESTIDNLNK I LQVFV	310	315	320	325	330	335	340	345	350	355
2	IPFLRKGVPLHL I ASPFPEVWH TMDNEENLHASTIDNLNK I I QVFV	310	315	320	325	330	335	340	345	350	355
3	IPFLRKGVPLHL I PSPFPEVWH SMDDDEGSLDESTIDNLNK I LQAFV	310	315	320	325	330	335	340	345	350	355
4	IPFLRRGVPVLHL I STPFPAVWH TPADEVNLPPTVHNL CR I LAVFL	330	335	340	345	350	355	360	365	370	375
5	IPFLRRGVPVLHL I ATPFPAVWH TPADEANLHPPTVHNL SR I LAVFL	330	335	340	345	350	355	360	365	370	375
6	IPFLRRGVPVLHL I ATPFPSVWH TPADEANLHPPTVHNL SR I LAVFL	330	335	340	345	350	355	360	365	370	375

**Abb. 28: Ausschnitt eines interspezifischen Aminosäuren „Sequenzalignement“ von QC/isoQC.** Dargestellt sind die Aminosäuren 116-355 verschiedener QCs sowie Aminosäuren 144-376 der entsprechenden isoQCs, die das aktive Zentrum bilden. Türkis unterlegt sind alle für MWT-S-17 relevanten Bindungen. 1. Aminosäuren der hQC; 2. Aminosäuren der mQC; 3. Aminosäuren der rQC; 4. Aminosäuren der hisoQC; 5. Aminosäuren der misoQC; 6. Aminosäuren der risoQC.

Bezugnehmend auf die Kristallstrukturüberlagerung („Strukturalignement“) fällt vor allem ein heterogener Abschnitt („flexibler Loop“) auf (siehe grüner Kasten in Abb. 29), in dem eine größere Varianz zwischen den einzelnen Sequenzen feststellbar ist. Dieser Unterschied beginnt an der Stelle mit der Aminosäuren-Nr. 299 (hQC, rQC), 300 (mQC), 320 (hisoQC, misoQC) bzw. 321 (risoQC). Alle QCs besitzen dort ein Tyrosin in der Sequenz, wohingegen die isoQCs ein Prolin aufweisen. Es folgen zwei für die Bindung irrelevante Aminosäuren, woran sich vier weitere relevante Aminosäuren anschließen. In diesem Aminosäureblock sind die ersten drei Aminosäuren zwischen QC und isoQC derselben Spezies unterschiedlich, die letzte ist bei allen Enzymen und Spezies Asparaginsäure. Zwischen hQC und rQC unterscheidet sich nur die erste Aminosäure: Das Valin der hQC ist im Kaninchenenzym gegen Leucin ausgetauscht. Die Sequenzen von hisoQC und risoQC sind identisch. Diese Sequenzunterschiede bedingen ein unterschiedliches Bindungsmuster für den Inhibitor MWT-S-17.



**Abb. 29: Aktive Zentren der übereinandergelegten Kristallstrukturen der hQC, hisoQC und mQC.** Orange: hQC. Blau: hisoQC. Beige: mQC. Schwarzer Kreis: MWT-S-17 an das Zink des aktiven Zentrums gebunden und in Abhängig von der Spezies unterschiedlich farbig dargestellt: Pink: hQC. Rostrot: hisoQC. Hellbraun: mQC. Grüner Kasten: „Flexibler loop“ gebildet durch Unterschiede in Aminosäure 299-305 (hQC).

Vergleichbarkeit der  $K_i$ -Werte: Auch aufgrund der in der Literatur angegebenen, experimentell bestimmten  $K_i$ -Werte von MWT-S-17 mit hQC, hisoQC, mQC und misoQC (CYNIS et al. 2011) sowie dem hier näherungsweise bestimmten  $K_i$ -Wert der unaufgereinigten exprimierten rQC lässt sich feststellen, dass die  $K_i$ -Werte der drei verschiedenen QCs alle in der gleichen Größenordnung von ca. 150 nM (hQC: 71 nM, mQC: 170 nM, rQC: 210 nM) liegen. Die Hemmkonstanten beider isoQCs sind mit ca. 240 nM noch ähnlicher (hisoQC: 236 nM, misoQC: 246 nM). Durch diese vergleichbare Aktivität ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass auch der  $K_i$ -Wert der Kaninchen isoQC mit MWT-S-17 in diesem Bereich liegt. Eine sichere Aussage dazu kann allerdings nur nach experimentellem Nachweis getroffen werden.

Im Zusammenhang betrachtet weisen die hier diskutierten Daten sehr stark darauf hin, dass die Aktivität von MWT-S-17 in Bezug auf die rQC/isoQC, einen mit humanen Enzymen vergleichbaren Effekt erwarten lässt. Somit ist der Inhibitor auch für das Kaninchenmodell geeignet.

## 5.4 Orale Behandlung mit MWT-S-17

Praktische Anwendung: Die orale Behandlung drei Mal täglich (6:00, 14:00, 22:00 Uhr) stellte eine hohe Stressbelastung für die Tiere dar. Vor allem abends wurden die Kaninchen durch Licht, Lärm und Herausnahme aus ihrem Käfig in ihrer Ruhephase gestört. Dazu kam die orale Gabe mit einem relativ großen Volumen (10 - 12 ml pro Tier), was durch die hohe zu verabreichende Wirkstoffdosis zwingend erforderlich war. Die Akzeptanz der Tiere bei oraler Gabe war relativ gering und oft mit Abwehrbewegungen verbunden, so dass eine sichere Applikation der gesamten Wirkstoffdosis nicht möglich war. Auch die Formulierung des Vehikels zur Herstellung einer Suspension war unvorteilhaft. Zwar wurde die entsprechende Applikationslösungen vor jeder Medikamentengabe immer frisch hergestellt, jedoch war diese nicht ausreichend lange stabil, so dass sich der Wirkstoff teilweise noch vor der oralen Gabe in der Spritze abgesetzt hatte, was die Applikation erschwerte.

Für nachfolgende Versuche, bei denen der Wirkstoff oral verfügbar sein soll, wäre (Geschmacksneutralität des potentiellen Wirkstoffs vorausgesetzt) eine Einmischung in die Futterm pellets oder das Trinkwasser wünschenswert. Anderenfalls sollte der Wirkstoff potent genug sein, um in geringeren Dosen, sowie in Lösung appliziert werden zu können (maximal 3 ml pro Tier). Die Dosierungsfrequenz sollte so gering wie möglich sein.

Falls das Versuchsziel es zulässt, wäre eine direkte Wirkstoffbeschichtung auf dem Stent günstig, da den Tieren der Stress durch die orale Behandlung erspart bliebe und das Arzneimittel direkt vor Ort wirken könnte. So könnten auch zwei unterschiedliche Stents in einem Tier getestet werden, die dann zweifelsfrei als einzelne Versuchseinheiten behandelt werden könnten.

Theoretischer Wirkmechanismus: In Mäusen wurde gezeigt, dass hauptsächlich die isoQC für die Reifung von CCL2 verantwortlich ist (CYNIS et al. 2011, BECKER et al. 2016). Diese ist im Golgi-Apparat lokalisiert (CYNIS et al. 2008). Aus diesem Grund muss die Substanz, welche die CCL2-Reifung verhindern soll, in den Golgi-Apparat der Zellen gelangen. Bei der Biosynthese und dem Transport von CCL2 vom Zytoplasma (pH 6,7 - 7), über das endoplasmatische Retikulum (pH 7), den Golgi-Apparat (pH 6,0 - 6,7), zu den sekretorischen Vesikeln (pH 5,5) zur finalen Sekretion, z.B. in das Blut (pH 7,4) fällt ein deutlicher pH-Gradient auf (VAN LIMBURG STIRUM 2008, HÖHNE et al. 2011). Insbesondere der Golgi-Apparat und die sekretorischen Vesikel besitzen einen (schwach) sauren pH. Der  $pK_a$  Wert des  $N_3$ -Stickstoffes

des Imidazolrings von MWT-S-17 beträgt 6,79 (vergleiche Tbl. 12). Bei diesem pH-Wert liegt dieser im gleichen Verhältnis protoniert und deprotoniert vor. Bei Imidazolderivaten wie MWT-S-17 gilt, dass sie nur an das Zinkion des aktiven Zentrums des Enzyms binden können, wenn das Stickstoffatom des Imidazolrestes deprotoniert vorliegt. Bei schwach sauren pH-Werten, wie sie im Golgi-Apparat vorherrschen, liegt das N<sub>3</sub>-Stickstoffatom des Imidazolrestes demnach größtenteils protoniert vor und eine Bindung an das Zinkion des aktiven Zentrums der isoQC kann nicht mehr effektiv erfolgen (BUCHHOLZ 2007).

Der bei der Auswertung des Wirkstoffprofils errechnete Minimalwert der Serum-Inhibitorkonzentration liegt konstant über dem zehnfachen K<sub>i</sub> von 2,1 µM. Laut Literaturangaben (LILLY 2007) wird in dieser Größenordnung eine vollständige Hemmung des Enzyms in Lösung erwartet. Dieses vereinfachte Rechenmodell kann die erfolgte Enzymhemmung allerdings nur näherungsweise beschreiben, da Faktoren wie die Plasmaproteinbindung (hier 33 %) sowie Wechsel zwischen Aufnahme- und Wirkort nicht berücksichtigt werden.

Da es aktuell keine gesicherten Informationen darüber gibt, wie hoch die Inhibitorkonzentration von MWT-S-17 nach Diffusion in den intrazellulären Kompartimenten und damit im Golgi-Apparat ist, kann über die tatsächlich erreichte isoQC Hemmung bei schwach saurem pH keine finale Aussage getroffen werden.

## 5.5 Kritische Betrachtung des verwendeten Tiermodells

Aus der Literatur geht hervor, dass es unabhängig vom Versuchsaufbau zu einer hohen Streuung der Neointimabildung zwischen den einzelnen Experimenten kommen kann. In dieser Machbarkeitsstudie („proof of principle“) (SCHMIDT 2006) fiel die Wahl aufgrund logistischer Überlegungen sowie der reduzierten Tierbelastung auf den Versuchsaufbau nach LANGHEINRICH. Problematisch am erzielten Versuchsergebnis ist, dass sich die morphometrischen Parameter zwischen Positiv- und Negativkontrolle nicht signifikant unterscheidet. Prednison hatte in diesem Experiment also keinen erkennbaren Einfluss auf den Ausbildungsgrad der ISR. Das könnte einerseits daran liegen, dass die von RIBICHINI et al. 2007 veröffentlichte Studie, in der die ISR durch orale Prednisonaufnahme gehemmt wurde, nicht in dem verkürzten Versuchsaufbau reproduzierbar ist (vergleiche Abschnitt 5.2). Ein anderer Grund dafür kann sein, dass die erzeugte Neointimabildung in dem hier beschriebenen Modell generell moderat ist, so dass Behandlungseffekte nicht sichtbar werden. Eine funktionierende Therapie braucht im Tierversuch einen großen Effekt um statistisch nachweisbar zu sein. Je größer die Pathologie (hier die ISR), desto besser sichtbar ist der Therapieerfolg, also die Reduktion des pathologischen Merkmals.

Nachfolgend sind tabellarisch (siehe Tbl. 16) einige der in der aktuellen Literatur veröffentlichten Kenndaten der unbehandelten Kontrollgruppen aus ISR-Kaninchenmodellen zusammengetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit handelt es sich ausschließlich um Versuche, bei denen zwischen Stentimplantation und Tötung der Tiere vier Wochen liegen. Oft wird nur eine der vielen möglichen Kenngrößen angegeben, was die Modelleruierung erschwert. Die prozentualen Stenoseangaben bei Endotheldenudation und Stentimplantation in einem Eingriff reichen von 18 - 35,4 %. Damit sind die in diesem Versuch in der Negativkontrolle erreichten 16 % relativ gering. Trotzdem ist die Neointimabildung mit  $0,75 \text{ mm}^2$  (im Vergleich zu zwei anderen Publikationen, siehe Tbl. 16) fast doppelt so groß. Eine statistische Signifikanz, die in anderen Publikationen ausreichend scheint, kann in dem hier durchgeführten Experiment dennoch nicht erreicht werden.

Bei einer potentiellen Wiederholung des Versuchsaufbaues mit Testung einer anderen Substanz sollte deshalb eine Methode gefunden werden, die Restenoserate zu vergrößern um Therapieeffekte morphologisch besser darstellen zu können.

**Tbl. 16:** Erhobene Parameter der unbehandelten Kontrollgruppen einiger ISR Kaninchenmodelle im Vergleich.

<i>Modell</i>			<i>Parameter</i>			
<b>Quelle</b>	<b>Futter</b>	<b>Modellablauf</b>	<b>N in mm<sup>2</sup></b>	<b>M in mm<sup>2</sup></b>	<b>N/M</b>	<b>S in %</b>
RUITER et al. 2015	Standard	Stentimplantation direkt nach PTA (keine Plaque)	n.a.	n.a.	n.a.	18
ZHOU et al. 2015	28 d 1 % Cholesterin	1. Restenosemodell: PTA für Plaqueinduktion; 4 Wochen später erneute PTA	2,13	n.a.	n.a.	89
		2. Atherosklerosemodell: einmalige PTA	0,37	n.a.	n.a.	35,4
HAN et al. 2016	Standard	Nur Stentimplantation (keine Plaque, keine PTA)	0,36	n.a.	0,67	n.a.
WANG et al. 2016	28 d 0,25 % Cholesterin	Nur Stentimplantation (keine Plaque, keine PTA)	n.a.	n.a.	1,98	n.a.
NYKIEL 2017	28 d 1 % Cholesterin	2 Wochen vor Operation Cholesterinfutter, Stentimplantation direkt nach PTA (keine Plaque)	0,75	0,28	2,8	16

Die Zeit zwischen Stentimplantation und Tiertötung beträgt in allen angegebenen Versuchen 4 Wochen.

N: Neointimafläche

M: Mediafläche

N/M: Neointima zu Media Verhältnis

S: Stenose

n.a.: nicht angegeben

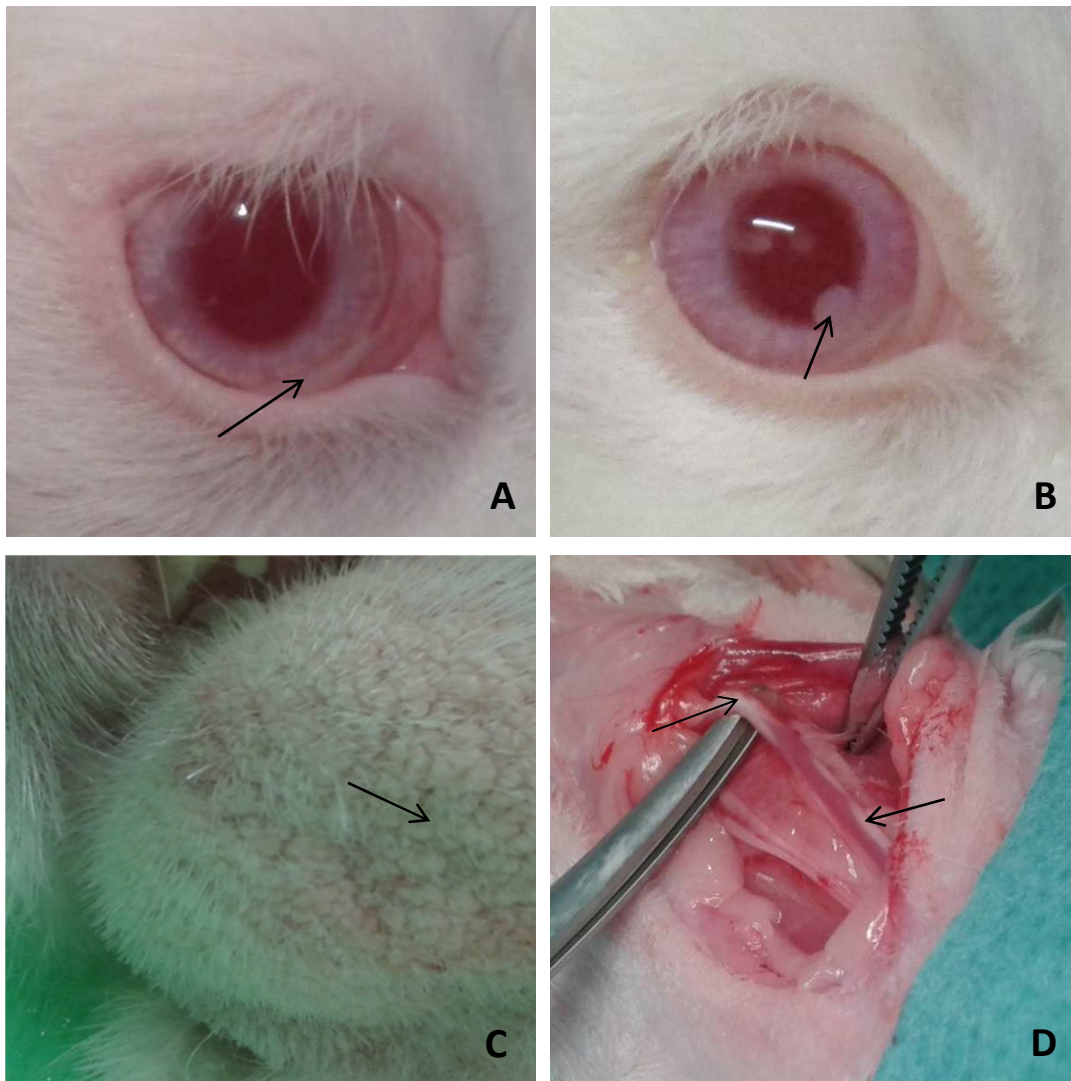
## 5.6 Belastungseinschätzung

Die retrospektive Belastungseinschätzung des Versuches deckt sich mit dem prospektiv vermuteten Grad, der bei gering- bis mittelgradig liegt. Der mittlere Score der klinisch gesunden Tiere im Behandlungsversuch lag pro Tag bei 0,62 (minimal 0 bis maximal 11) und war somit als gering anzusehen (Scoresheet siehe unter 9.4). Abweichungen vom Wert 0 kamen in der Regel durch reduzierte Futteraufnahme oder Gewichtsverlust zustande.

Die Operation führte nur zu geringen und kurzandauernden Schmerzen, Leiden und Schäden. Eine höhere Belastung wurde bei den Tieren wahrscheinlich durch das Füttern der unphysiologischen Cholesterindiät hervorgerufen. Die Organveränderungen ließen sich zwar nicht durch Bestimmung klinischer Parameter belegen, es fielen jedoch alle Tiere bereits nach vier Wochen Cholesterinfutteraufnahme in der Sektion mit einer mittelgradigen Leberverfettung auf. Ein Tier der PK wies eine hochgradig gefüllte Gallenblase auf. Der Gallengang war nicht durchgängig, Konkrementablagerungen fehlten. Zwei von sechs Tieren der PK, welche die cholesterinreiche Diät für 6 Wochen erhalten hatten und nach diesem Zeitraum wieder auf Normalfutter umgestellt wurden, entwickelten ab der fünften Woche okuläre Cholesterinausfällungen, die laut VASS et al. (1969) als Zeichen für generalisierte Atherosklerose gelten (siehe Abb. 30). Außerdem waren mikroskopisch sichtbare Plaques in der *A. carotis communis* nachweisbar.

Histologisch wurden mittelgradige Cholesterinkristallausnadelungen im Bereich des Ziliarkörpers und des *Stratum pigmentosum* sowie zahlreiche schaumige Makrophagen nachgewiesen. Bei einem Tier wurde eine diffuse Ablösung der Retina beobachtet. Des Weiteren wurden Lipidansammlungen in der Haut, vor allem an Kinn und Mundpartie, koinzidiert mit den okulären Cholesterinablagerungen gefunden. Diese *Xanthome* treten auch beim Menschen, unter anderem bei gestörtem Fettstoffwechsel auf (HARDMEIER 1973). Anders als in Teilen der Fachliteratur beschrieben, entwickelte kein Tier Pfotenläsionen durch Hautatropie (GV-SOLAS/ TVT 2010).





**Abb. 30: Klinische Symptome einer systemischen Atherosklerose im Kaninchnemodell.** Zur Veranschaulichung wurden Pfeilmarkierungen eingefügt. A & B: Okuläre Cholesterinausfällung; C: Xanthombildung am Kinn; D: Makroskopisch sichtbare Plaques an der *A. carotis communis* (12 Wochen nach Beginn der 6 wöchigen alimentären Atheroskleroseinduktion).

## **5.7 Verendete Tiere und Einfluss der symptomatischen Behandlung**

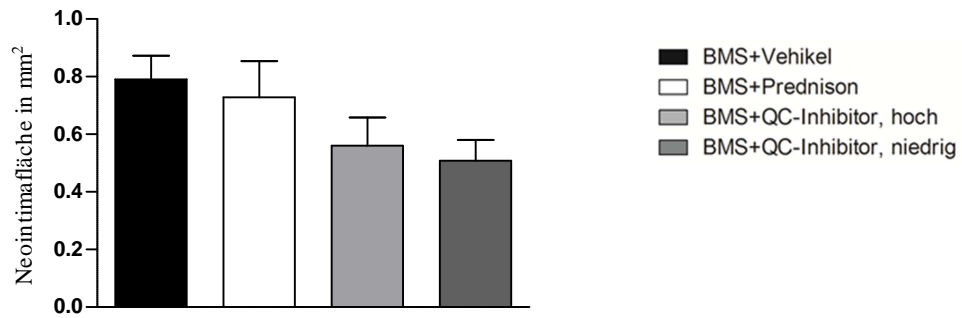
Die frühe Sterblichkeit der Tiere zog sich durch alle Behandlungsgruppen und hatte mit hoher Wahrscheinlichkeit nichts mit der Stentimplantation, der alimentären Atheroskleroseinduktion oder der Inhibitorgabe zu tun. Die betroffenen Kaninchen wurden 14 - 21 Tage nach der Operation mit Atemgeräuschen auffällig. Ab diesem Zeitpunkt wurden sie symptomatisch mit Salbutamol, Budesonid und Furosemid behandelt. Vier der 12 behandelten Tiere erreichten das reguläre Versuchsende und gingen in die Versuchsauswertung mit ein. Deshalb sollen im Folgenden die Einflüsse der medikamentösen Zusatzbehandlung (vergleiche 4.4.1) auf das Versuchsergebnis allgemein bzw. die Neointimaproliferation im Speziellen diskutiert werden.

Budesonid ist ein Glucocorticoid, Salbutamol ein Betasympathomimetikum. Beide Wirkstoffe haben lokale Wirkung auf die glatten Muskelzellen, die allerdings aufgrund der unsicheren Anwendungsform (Inhalation bei Aspiration) wahrscheinlich zu wenig Wirkung gezeigt haben, weshalb sie hier nicht diskutiert werden sollen.

Furosemid, durch Verdacht auf ein akutes Lungenödem indiziert, könnte dabei einen größeren Einfluss gehabt haben als die beiden anderen Medikamente. Bei Furosemid handelt es sich um ein Schleifendiuretikum, welches sich an der luminalen Seite des aufsteigenden Schenkels der Henle-Schleife an Chlorid-Bindungsstellen anlagert und so den Natrium/Kalium/2-Chlorid-Cotransporter hemmt, wodurch das Gegenstromprinzip aufgehoben wird. Kalium- und Calciausscheidung sind erhöht und es findet eine schwache Hemmung der Carboanhydrase statt, die jedoch keine Relevanz für die Wirkung hat (FREY et al. 2010). Wie andere Schleifendiuretika auch hat Furosemid eine blutdrucksenkende Wirkung. Diese ist allerdings von einer kürzeren Dauer und es kommt nicht zu einer zusätzlichen arteriellen Vasodilatation (SIFFERT et al. 2001). Dennoch hat die Höhe des Blutdruckes Einfluss auf die Restenoserate. TOCCI et al. zeigten 2016, dass ein normaler Blutdruck von KHK-Patienten bei der PTA das Risiko einer ISR um fast 24 % (im Vergleich zu Bluthochdruckpatienten) senkte. Insofern hätte sich der blutdrucksenkende medikamentenassoziierte Effekt der letzten Lebenstage bei den vier Tieren (zwei in der Negativkontrollgruppe, zwei aus der niedrig dosierten Inhibitorgruppe) mit einer reduzierten Neointimabildung auswirken können.

Werden die vier betroffenen Tiere nicht mit in die statistische Berechnung eingebracht, ist der Trend des Behandlungseffektes optisch schneller zu erfassen. Die niedrig dosierte Inhibitor-

Behandlungsgruppe zeigt ein ähnliches Ergebnis wie die hochdosierte Gruppe. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 31 beispielhaft für die Neointimaflächenbildung gezeigt. Eine statistische Signifikanz bleibt dennoch aus.



**Abb. 31: Neointimafläche im Gruppenvergleich der Tiere ohne symptomatische Furosemidbehandlung.** One-way ANOVA, Tukey post-hoc Test, MW ± SD, n = 4-6.

## 5.8 Interpretation der Versuchsergebnisse

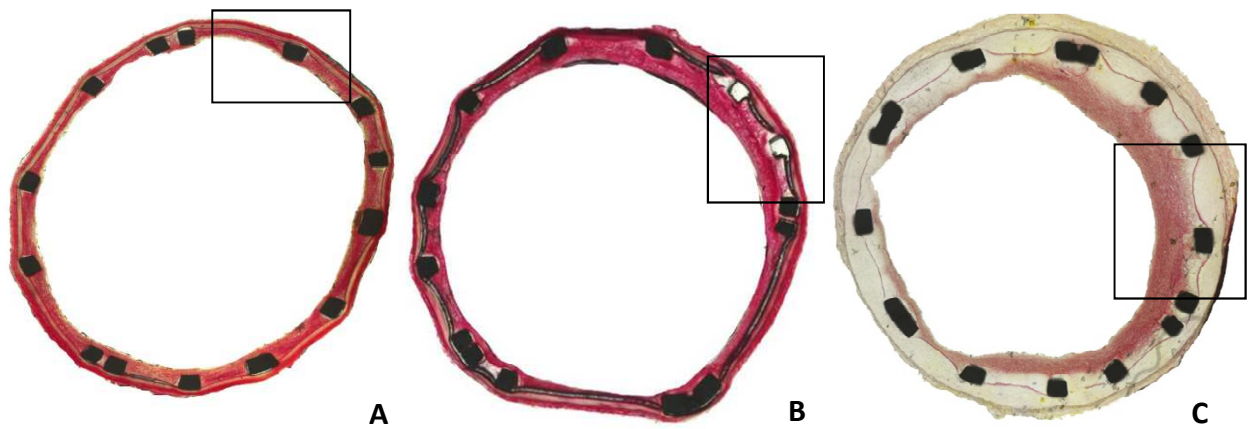
Histologie: Die gestenteten Arterien mussten in Kunststoff eingebettet werden, da das Material herkömmlicher Einbettmethoden zu weich ist, um das Metallgerüst des Stents beim Probenschneiden zu fixieren. Es können Methoden der Heißeinbettung mittels Polymethylmethacrylat (PMMA) und Kalteinbettung z.B. in Technovit unterschieden werden. Da ein Ziel der Arbeit der Nachweis einer Monozyten-beeinflussenden Wirkung von MWT-S-17 *in vivo* mittels Immunhistologie war, fiel die Wahl auf die Kalteinbettung mit Technovit 9100. Normalerweise werden Semidünnschnitte mittels Mikrotomie angefertigt, die zuvor nach einem etablierten Standardprotokoll entplastet werden müssen (bei 5 µm dicken Schnitten jeweils 2 x 20 min Xylol und 2 x 20 min Methoxyethylacetat). Jedoch waren die Mikrotomschnitte nicht ohne Strukturverlust anzufertigen, was an den innerhalb des Präparates auftretenden Härteunterschieden (Gewebe und Metall) lag.

Die Messgenauigkeit der erhobenen Daten ist als relativ gut einzuschätzen, da unterschiedlich gefärbte Gewebeflächen vom Rechner bestimmt und vom Anwender lediglich feinabgestimmt wurden. Diese Methode ist präziser als manuell die Gewebe zu markieren, wie es in herkömmlichen Arbeiten beschrieben wird (DIETRICH 2002, MALLE 2013). Da die Auswertung verblindet stattfand, kann davon ausgegangen werden, dass der Korrekturfehler der Flächenberechnung bei allen Proben einheitlich ist.

Die Ergebnisse der morphometrischen Untersuchungen sind bis auf die Ausnahme der Parameter % Stenose und % verbleibendes Lumen nicht statistisch signifikant (vergleiche Abb. 20). Der Unterschied besteht zwischen den Gruppen der hohen Inhibitor-dosis und der Positivkontrolle (bei der die Predisonbehandlung, wie unter 5.5 bereits dargestellt, keinen Einfluss hatte). Das könnte an dem unterschiedlichen Druck bei Gefäßaufdehnung und Stentimplantation liegen. Je nach Dehnungsgrad der *Lamina elastica interna* fällt in Abbildung 31 die breitere *Tunica media* auf, die wahrscheinlich den größten Einfluss auf die Ausbildung des Restenosegrades hat (ROGER et al. 1996).

Dennoch wäre auch der Gefäßabschnitt in Abbildung 32 C bei Beurteilung mit Hilfe des Neuen Verletzungsscores nicht höher als 2 anzusiedeln, da die *Lamina elastica interna* noch nicht rupturiert ist (bei der dargestellten Vergrößerung nicht zu sehen). Somit scheinen die Aussagen zwischen benutzen Scores der verwendeten Entzündungsparameter und der mor-

phologischen Erscheinung zum Teil nicht gut zu korrelieren. Möglicherweise wäre eine feingliedrigere Punkteverteilung beim Neuen Entzündungsscore zielführend.



**Abb. 32: Gefäße mit unterschiedlichen Ausprägungen des „Neuen Verletzungsscores“.** Durch den höheren Verletzungsgrad der *Tunica media* resultiert eine vermehrte Neointimaausbildung (schwarzer Kasten). Movat Pentachrom, 40xfach vergrößert. A: *Tunica media* kaum gedehnt, wenig ISR; B: *Tunica media* geringgradig (ggr.) gedehnt, ggr. ISR; C: *Tunica media* mittelgradig (mgr.) gedehnt, mgr. ISR.

Spezifische QC-Aktivität und Genexpression von CCL2, QC und isoQC im Gefäß: Die Bestimmung der spezifischen QC-Aktivität zeigt einen statistisch signifikanten ( $p < 0,05$ ) Aktivitätsunterschied zwischen der Gruppe, die mit der hohen Inhibitor-Dosis behandelt wurde und der Positivkontrolle. Dieses Ergebnis sollte jedoch unter Vorbehalt diskutiert werden. Einerseits ist die Qualität der berechneten linearen Regressionsgeraden (siehe Abb. 22) gering, andererseits musste die ohnehin kleine Probenanzahl zusätzlich noch zusammengefasst werden. Dennoch stimmen die Größenordnungen der gemessenen Aktivitäten mit den erwarteten Werten speziesübergreifend überein. SCHILLING et al. (2011) geben für verschiedene Hirnareale von Mäusen Werte von ca. 0,018 - 0,042 nmol/(mg\*min) an, die auch dem Mittelwert beider Kontrollgruppen bei ca. 0,018 nmol/(mg\*min) entsprechen.

Auch die Daten der Expressionsanalysen basieren nur auf einer geringen Probenanzahl, weshalb die Ergebnisse höchstens als Trend diskutiert werden sollten. Eine statistische Analyse war aufgrund der inhomogenen Gruppengröße nicht möglich.

Zusammenfassend kann eine erfolgreiche ISR Modelletablierung festgestellt werden. Eine potentielle Wirkstoffkomponente zeigte *in vivo* positive Trends in der Morphometrie, QC-Inhibition und Veränderung der Genexpression des Zielmoleküls CCL2.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Vera Nykiel

**Einfluss eines Inhibitors der Glutaminylzyklase auf die in-Stent Restenose im atherosklerotischen Kaninchenmodell**

**Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig**

Eingereicht im August 2016

95 Seiten, 33 Abbildungen, 29 Tabellen, 145 Literaturangaben, 22 Seiten Anhang

*Schlüsselwörter: in-Stent Restenose, Atherosklerose, PTA, CCL2, QC, isoQC*

*Einleitung:* In den westlichen Industrienationen sterben mehr Menschen an den Folgen der Atherosklerose als an Krebserkrankungen. Dieser multifaktoriell bedingte, degenerative Prozess der Arterien zeichnet sich durch Gefäßwandverdickungen, sogenannte Plaques aus. Diese können eine reduzierte Durchblutung bis hin zur Unterversorgung und Infarkten in den betreffenden Organen zur Folge haben. Die konventionelle, minimalinvasive Therapie in der Humanmedizin ist die Perkutane Transluminale Angioplastie (PTA). Durch einen arteriellen Gefäßzugang wird das stenosierte Gefäß mittels Ballondilatation wiedereröffnet. Optional wird eine Gefäßstütze (Stent) implantiert, um die atherosklerotische Arterie offen zu halten. In 20 - 30 % der Fälle kommt es noch immer, trotz jahrelanger Forschungsarbeit, zum Wiederverschluss der Gefäße. Die Auslöser dieses Prozesses, der in-Stent Restenose (ISR), sind noch nicht vollständig aufgeklärt und es fehlt eine wirksame Prophylaxe.

Eine Hypothese stellt die überschießende Monozyteninvasion in das Gefäßendothel nach Dehnungsreiz durch PTA in den Vordergrund, die durch die Ausschüttung des Monozytenanlockenden Chemokin CCL2 induziert wird. Dessen metabolische Stabilität und chemotaktische Potenz, wird durch Bildung eines N-terminalen Pyroglutamatrestes vermittelt, welche durch das Isoenzym der Glutaminylzyklase, (isoQC) katalysiert wird.

*Ziel der Untersuchung:* Das Ziel der vorliegenden Studie war es, in einem geeigneten Tiermodell die isoQC nach Stentimplantation zu hemmen, dadurch die Konzentration von poten-tem CCL2 zu reduzieren und somit den potentiellen, für die ISR mitverantwortlichen Wirkmechanismus der Monozyteninvasion *in vivo* zu eruieren.

*Tiere, Material und Methoden:* Zur Modelletablierung, sowie der vergleichenden Durchführung einer Pharmakokinetikstudie mit zwei potentiellen, nicht selektiven QC/isoQC-Inhibitoren, dienten 12 weiße Neuseelandkaninchen (NZW). Nach *in vitro* Charakterisierung der Inhibitoren und Analyse der pharmakologischen Parameter wurde der besser bioverfügbare Inhibitor (MWT-S-17) für den Behandlungsversuch ausgewählt. Dafür wurde in 28 weiblichen NZW alimentär Atherosklerose induziert (Fütterung einer 1 % cholesterinhaltigen Diät). Nach 14 Tagen wurden den Tieren mittels PTA bilateral Stents in beide *Aa. iliacae externae* implantiert und sie anschließend randomisiert vier Gruppen zugeordnet. Zwei Gruppen bekamen in unterschiedlichen Dosierungen dreimal täglich, für insgesamt vier Wochen, den Inhibitor oral. Die anderen beiden Gruppen dienten als Positiv- und Negativkontrolle. Erstere erhielt Prednison, was laut Literaturangaben bei oraler Gabe die ISR reduziert, letztere nur das Vehikel.

Unmittelbar nach Tötung der Tiere wurden die gestenteten Gefäße gespült und entnommen. Ein Teil der Probe wurde in Technovit 9100 eingebettet und in Anlehnung an die Trenn-Dünnschliff-Technik histologisch aufgearbeitet und gefärbt (Giemsa- und modifizierte Movat-Pentachrom Färbung nach VERHOEFF). Anschließend wurden die Schliffe digitalisiert und die Giemsa gefärbten Proben mikroskopisch auf Entzündungszeichen untersucht. Außerdem fanden morphometrische Auswertungen an Movat-Pentachrom gefärbten Schliffen statt, um die ISR zu quantifizieren. Der andere Probenteil wurde zur QC-Aktivitätsmessung, sowie zur Untersuchung der relativen Genexpression von QC, isoQC und CCL2 verwendet.

*Ergebnisse:* Die histologischen Ergebnisse bezüglich der Entzündungsparameter wiesen keine Unterschiede auf. Bei der Morphometrie ergab sich eine statistische Signifikanz bezüglich des Stenosierungsgrades zwischen der Positivkontrolle und der Behandlungsgruppe, welche die hohe Dosis QC/isoQC-Inhibitor erhielt. Dieser Befund lässt sich auch bei der Hemmung der QC-Aktivität im homogenisierten Gefäß erheben. Die Untersuchung zur relativen Genexpression kann, aufgrund zu kleiner Stichprobenmengen, nur als Trend diskutiert werden.

*Schlussfolgerungen:* Zusammenfassend erscheint das Kaninchenmodell zur Induktion der ISR für weitere Untersuchungen geeignet, sollte aber hinsichtlich des Ausbildungsgrades der Pathologie verbessert werden, um Therapieeffekte stärker sichtbar zu machen.

Dieses Experiment kann Hinweise auf die Wirksamkeit eines oral verabreichten QC/isoQC-Inhibitors als neues Zielmolekül zur Reduktion der ISR geben.

## 7 SUMMARY

**Vera Nykiel**

**Effect of Inhibition of Glutaminyl Cyclases on in-Stent restenosis in an atherosclerotic rabbit model**

**Department of Small Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig**

Submitted in August 2016

95 pages, 33 figures, 29 tables, 145 references, 22 appendices

*Keywords: in-stent restenosis, atherosclerosis, PTA, CCL2, QC/isoQC*

*Introduction:* In industrialized nations morbidity from consequences of atherosclerosis is higher than morbidity related to cancer. This multifactorial degenerative process of arteries is characterized by vascular wall thickening (plaques), reduced blood flow up to insufficient supply of blood or infarct of respective organs. The conventional, minimally invasive therapy is percutaneous transluminal angioplasty (PTA). Through an arterial access, the stenotic vessel is reopened by balloon dilatation. Optionally, a stent is implanted to keep the atherosclerotic artery open. Despite several years of research, in 20 – 30 % of cases a restenosis of the vessel can be observed. This process is called in-Stent restenosis (ISR). The trigger for ISR is not fully understood and consequently, no effective therapy against ISR has been described to date. A commonly accepted hypothesis puts the invasion of monocytes into the vascular endothelium after PTA-stretching into the focus of research. The invasion is induced by the release of monocyte attractant chemokine CCL2. Its chemotactic activity and protection against degradation by aminopeptidases depends on a pyroglutamate-modified N-terminus, which is generated by catalysis of the isoenzyme of glutaminyl cyclase (isoQC).

*Aim of the study:* Aim of the study was to test whether the inhibition of isoQC in a suitable animal model of ISR reduces the QC/isoQC-activity and CCL2 concentration. Furthermore, the effect of reduction of the aforementioned biochemical parameters on ISR was to be determined.



*Animals, materials and methods:* For establishing the rabbit ISR model and for pharmacokinetic studies of two potential, nonselective QC/isoQC-inhibitors, 12 New Zealand White rabbits (NZW) were used. After *in vitro* characterization of two inhibitors and the analysis of their pharmacological profiles, the inhibitor with the higher bioavailability, MWT-S-17, was selected for the treatment trial. For the main experiment, alimentary atherosclerosis was induced in 28 female NZW by feeding a 1 % cholesterol-containing diet. After 14 days, a PTA was performed and stents were bilaterally placed in both *Aa. iliacaе externaе*. Afterwards the animals were randomly assigned into four groups. Two groups were orally treated with MWT-S-17 in two different doses, three times a day for a total of four weeks. The other two groups were used as positive and negative controls. The positive control received prednisone, which, according to the literature, reduces ISR after oral administration. The negative control was treated with vehicle only. Immediately after sacrificing the animals, the stented vessels were rinsed and removed. A part of the sample was embedded in Technovit 9100 and processed for histological examination based on a cutting-grinding technique. Samples were stained using Giemsa stain and a modified Movat Pentachrom stain after VERHOEFF. Subsequently, the sections were digitalized and examined microscopically for signs of inflammation. Moreover morphometric evaluations were performed in order to quantify the ISR. Another part of the samples was used for QC-activity measurements and for gene expression analysis of QC, isoQC and CCL2.

*Results:* The histological results comprised inflammatory parameters, which did not show signs of inflammation in stented vessel segments. In addition, the morphometry results revealed a statistical significance of the level of stenosis between the positive control and the treatment group, receiving the high dose QC/isoQC-inhibitor. This finding was also confirmed by analysis of QC-activity in the homogenized vessel segments, showing a reduced activity upon treatment. Influenced gene expression of CCL2 was also observed, however, the results should be discussed only as a trend due to small sample sizes.

*Conclusion:* In summary, the rabbit model of ISR appears suitable for further studies, but should be improved in terms of extent of elicited ISR in order to ensure a better visibility of treatment effects.

The presented results provide a basis to test the effectivity of orally administered QC/isoQC-inhibitors as novel molecules for reduction of ISR.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: Receptor Structure, Interactions, and Antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* 2007;25:787–820.

Araki T, Nakamura M, Sugi K. Characterization of in-stent neointimal tissue components following drug-eluting stent implantation according to the phase of restenosis using a 40-MHz intravascular ultrasound imaging system. *J Cardiol.* 2014;64(6):423-429.

Bankl H. Gefäße. In: Bankl H, Hrsg. *Arbeitsbuch Pathologie III. Spezielle Pathologie, Teil 1.* 1. Aufl. Wien: Facultas Universitätsverlag; 1999. p. 43-45.

Basavarajaiah S, Latib A, Shannon J, Naganuma T, Sticchi A, Bertoldi L, et al. Drug-Eluting Balloon in the Treatment of In-Stent Restenosis and Diffuse Coronary Artery Disease: Real-World Experience from Our Registry. *J Interv Cardiol.* 2014;27(4):348-355.

Baumgärtner W. Herz- und Kreislauforgane, Körperhöhlen. In: Baumgärtner W, Hrsg. *Pathohistologie für die Tiermedizin.* 2. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 2012. p. 88-89.

Bauriedel G, Hutter R, Schluckebier S, Welsch U, Forney Prescott MF, Kandolf R, et al. Verminderte Apoptose als Pathogenesefaktor der intimalen Hyperplasie humaner Arterioskleroseläsionen. *Zeitschrift für Kardiologie.* 1997;86(8):572-580.

Bauters C, Isner JM. The biology of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis.* 1997;40(2):107–116.

Beatty TH, Prenger VL, Virgil DG, Lewis B, Kwiterovicht PO, Bachorik PS. A Genetic Model for Control of Hypertriglyceridemia and Apolipoprotein B Levels in the Johns Hopkins Colonoyf St. Thomas Hospital Rabbits. *Genetics.* 1992; 132(4):1095-1104.

Becker A, Eichentopf R, Sedlmeier R, Waniek A, Cynis H, Koch B, et al. IsoQC (QPCTL) knock-out mice suggest differential substrate conversion by glutaminyl cyclase isoenzymes. *Biol Chem.* 2016;397(1):45-55.

Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galaray RE, Reidy MA. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res.* 1994;75:539-545.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Enzyme: Grundlegende Konzepte und Kinetik. In: Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Hrsg. *Stryer Biochemie.* 7. Aufl. Heidelberg: Springer; 2014. p. 243.

Bestehorn HP. Die PTCA-Restenose. In: Bestehorn HP, Hrgsg. *Interventionelle Kardiologie. Koronarangiographie u. PTCA-Indikation, Technik, Nachsorge.* 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2001. p.147-157.

- Bitzer EM, Bohm S, Hartmann A, Priess HW. Barmer GEK Report Krankenhaus 2014. Schwerpunktthema: Trends in der koronaren Revaskularisation. 1. Aufl. Siegburg: Asgard Verlagsservice GmbH; 2014.
- Buchholz M. Inhibitoren der Glutaminyl Cyclase. Synthese, Charakterisierung und in-silico Untersuchungen. [Dissertation rer. nat.]. Halle: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; 2007.
- Buddeke E. Polygene Erkrankungen. In: Buddeke E, Hrsg. Molekulare Medizin: eine systematische Einführung. 1. Aufl. Landsberg: Ecomed-Verlag; 2002. p. 136-143.
- Busby WH, Quackenbush GE, Humm J, Youngblood WW, Kizer JS. An enzyme(s) that converts glutaminyl-peptides into pyroglutamyl-peptides. Presence in pituitary, brain, adrenal medulla, and lymphocytes. *J Biol Chem.* 1987;262(18):8532-8536.
- Campbell GR, Campbell JH. Smooth Muscle Phenotypic Changes in Arterial Wall Homeostasis: Implications for the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Exp Mol Pathol.* 1985;42(2):139-162.
- Carter AJ, Aggarwal M, Kopia GA, Tio F, Tsao PS, Kolata R, et al. Long-term effects of polymer-based, slow-release, sirolimus-eluting stents in a porcine coronary model. *Cardiovasc Res* 2004;63(4):617-624.
- Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *The Lancet.* 1992;340:1111-1115.
- Che HL, Bae IH, Lim KS, Uthaman S, Song IT, Lee H, et al. Novel Fabrication of MicroRNA Nanoparticle-Coated Coronary Stent for Prevention of Post-Angioplasty Restenosis. *Korean Circ J.* 2016;46(1):23-32.
- Cipollone F, Marini M, Fazia M, Pini B, Iezzi A, Reale M, et al. Elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with restenosis after coronary angioplasty. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001;21:327-334.
- Clarkson S, Newburgh LH. The Relation between Atherosclerosis and ingested Cholesterol in the Rabbit. *J Exp Med.* 1926;43(5):595-612.
- Cullen P, Baetta R, Bellosta S, Bernini F, Chinetti G, Cignarella A, et al. Rupture of the Atherosclerotic Plaque: does a Good Animal Model Exist? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(4):535-542.
- Cynis H, Rahfeld JU, Stephan A, Kehlen A, Koch B, Wermann M, et al. Isolation of an iso-enzyme of human glutaminyl cyclase: retention in the Golgi complex suggests involvement in the protein maturation machinery. *J Mol Biol.* 2008;379(5):966-980.

- Cynis H. Untersuchungen zur Rolle der Glutaminyl-Cyclase bei der pathologischen Bildung von Pyroglutamyl-Peptiden [Dissertation rer. nat.]. Halle: Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; 2009.
- Cynis H, Hoffmann T, Friedrich D, Kehlen A, Gans K, Kleinschmidt M, et al. The isoenzyme of glutaminyl cyclase is an important regulator of monocyte infiltration under inflammatory conditions. *EMBO Mol Med*. 2011;3(9):545-558.
- Cynis H, Schilling S, Demuth HU. Glutaminyl Cyclases. In: Kastin AJ, Hrsg. *Handbook of Biologically Active Peptides*. 2. Edition. San Diego, USA: Elsevier Inc; 2013. p. 1786-1742.
- Dangas GD, Claessen BE, Caixeta A et al. In-stent restenosis in the drug-eluting stent era. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56:1897–1907.
- Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J*. 1993;69(5):377-381.
- Deutsche Herzstiftung. *Deutscher Herzbericht 2013*. Frankfurt am Main; 2013. p. 6.
- Dietrich TJB. Prävention der Restenose nach Angioplastie durch 186 Rhenium Stents im Kaninchenmodell [Dissertation med.]. Tübingen: Eberhard - Karls – Universität zu Tübingen; 2002.
- Eble JA, Niland S. The extracellular matrix of blood vessels. *Curr Pharm Des*. 2009;15(12):1385-1400.
- Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA). Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals*. 2014;48(3):178-192.
- Ferrer MD, Esteban E, Liste F, Carrillo JM, Ramos JJ, Balastegui MT et al. The rabbit as an experimental model: technique for the induction of vascular lesions and incidents. *Radiologia*. 2010;52(1):45-50.
- Fischer WH, Spiess J. Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:3628-3632.
- Franzen D, Nolte C, Haude M, von Stocmeier CL, Albrecht D, Heublein B, et al. Follow-up and characteristics of restenoses after coronary stent implantation in asymptomatic patients and patients with few symptoms. *Z Kardiol*. 1994;83(2):155-160.
- Frey HH. Pharmakologie der Niere. In: Frey HH, Löscher W, Hrsg. *Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. 3. Aufl. Stuttgart: Enke; 2010. p. 226-227.

- Fruebis J, Gonzalez V, Silvestre M, Palinski W. Effect of probucol treatment on gene expression of VCAM-1, MCP-1 and M-CSF in the aortic wall of LDL receptor-deficient rabbits during early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(7):1289-1302.
- Furukawa Y, Matsumori A, Ohashi N, Shioi T, Ono K, Harada A, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries. *Circulation Research.* 1999;84:306-314.
- Gaemperli O, Lüscher TF. Historical Account: Interventional Cardiology. In: Lanzer P, Hrsg. *Catheter-Based Cardiovascular Interventions.* 1. Aufl. Heidelberg: Springer Science & Business Media; 2013. p. 6-11.
- Gesellschaft für Versuchstierkunde/Society of Laboratory Animal Science (GV Solas) & Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz e.V. (TVT). 2010. Tiergerechte Haltung von Versuchskaninchen. Merkblatt, Stand 7.1.10.
- Glaus T, Suter PF. Erkrankungen der peripheren Blut- und Lymphgefäße. In: Suter PF, Kohn B, Schwarz G, Hrsg. *Praktikum der Hundeklinik.* 11. Aufl. Stuttgart, Enke; 2012. p. 615.
- Grassia G, Maddaluno M, Guglielmotti A, Mangano G, Biondi G, Maffia P, et al. The anti-inflammatory agent bindarit inhibits neointima formation in both rats and hyperlipidaemic mice. *Cardiovasc Res.* 2009;84(3):485-493.
- Grundgeiger J. Pilotstudie zur diagnostischen Wertigkeit der Multidetektor- Computertomographie (MDCT) in der Früherkennung experimentell erzeugter atheromatöser Plaques am hypercholesterinämischen Weißen Neuseeland Kaninchen [Dissertation med.]. Tübingen: Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen; 2008.
- Grüntzig A, Schneider HJ. The percutaneous dilatation of chronic coronary stenoses-experiments and morphology. *Schweiz Med Wochenschr.* 1977;107(44):1588.
- Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, GK Sukhova, Libby P, et al. Absence of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Reduces Atherosclerosis in Low Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Molecular Cell.* 1998;2:275-281.
- Hagemann U. Charakterisierung des proinflammatorischen Phänotyps neointimaler glatter Gefäßmuskelzellen nach Gefäßverletzung [Dissertation med.]. Aachen: Medizinische Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen; 2008.
- Han B, Ge CQ, Zhang HG, Zhou CG, Ji GH, Yang Z, et al. Effects of tripterygium glycosides on restenosis following endovascular treatment. *Mol Med Rep.* 2016;13(6):4959-4968.
- Han KH, Tangirala RK, Green SR, Quehenberger O. Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(12):1983-1991.

- Hansen BF, Mortensen A, Hansen JF, Ibsen P, Frandsen H, Nordestgaard BG. Atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidaemic rabbits. Evaluation by macroscopic, microscopic and biochemical methods and comparison of atherosclerosis variables. *APMIS*. 1994;102(3):177-190.
- Hardmeier TH. Stoffwechselkrankheiten der Haut. In: Achten G, Grosshans E, Hardmeier TH, Mach K, Male O, Mehregan AH, et al, Hrsg. Haut und Anhangsgebilde. Spezielle Histopathologie. 1. Aufl. Heidelberg: Springer-Verlag; 1973. p. 384.
- Hemmerich S, Paavola C, Bloom A, Bhakta S, Freedman R, Grunberger D, et al. Identification of residues in the monocyte chemotactic Protein-1 that contact the MCP-1 receptor CCR2. *Biochemistry*. 1999;38(40):13013-13025.
- Hess RS, Kass PH, Van Winkle TJ. Association between diabetes mellitus, hypothyroidism or hyperadrenocorticism, and atherosclerosis in dogs. *J Vet Intern Med*. 2003;17(4):489-494.
- Hinz C. In-vivo-Studie über dezellularisierte Segmente der ovinen Aorta und der Arteria pulmonalis als Aortenersatz [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2013.
- Höhne W. Gerichtete Proteinverteilung ("Protein Targeting"). In: Püschel G., Kühn H, Doenecke D, Kietzmann T, Koolmann J, et al, Hrsg. Taschenlehrbuch Biochemie. 1. Aufl. Mannheim: Georg Thieme Verlag; 2011. p. 436.
- Hokimoto S, Oike Y, Saito T, Kitaoka M, Oshima S, Noda K, et al. Increased Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Atherectomy Specimens From Patients With Restenosis After Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty. *Circ J*. 2002;66:114-116.
- Holmes DR, Vlietstra RE, Smith HC, Vetrovec GW, Kent KM, Cowley MJ, et al. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA): a report from the PTCA Registry of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Am J Cardiol*. 1984;53(12):77C-81C.
- Horn A, Wagner H. Krankheiten des Kreislaufs. In: Gerlach U, Wagner M, Wirth W, Hrsg. Innere Medizin für Gesundheits- und Krankenpflege. 7. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2011. p. 269-272.
- Ialenti A, Grassia G, Gordon P, Maddaluno M, Di Lauro MV, Baker AH et al. Inhibition of in-stent stenosis by oral administration of bindarit in porcine coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(11):2448-2454.
- Ikeda U, Matsui K, Murakami Y, Shimada K. Monocyte chemoattractant protein-1 and coronary artery disease. *Clin Cardiol*. 2002;25(4):143-147.
- Iqbal J, Chamberlain J, Francis SE, Gunn J. Role of Animal Models in Coronary Stenting. *Ann Biomed Eng*. 2016;44(2):453-465.
- Jacob SW, Herschler R. Pharmacology of DMSO. *Cryobiology*. 1986;23(1):14-27.

- Kang YH, Lao HY, Yu XY, Chen JY, Zhong SL. Progress in genetic and epigenetic research on in-stent restenosis after percutaneous coronary interventions. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2012;29(1):38-42.
- Kapourchali FR, Surendiran G, Chen L, Uitz E, Bahadori B, Moghadasian MH. Animal models of atherosclerosis. *World J Clin Cases*. 2014;2(5):126-132.
- Khanna V, Jain M, Singh V, Kanshana JS, Prakash P, Barthwal MK, et al. Cholesterol Diet Withdrawal Leads to an Initial Plaque Instability and Subsequent Regression of Accelerated Iliac Artery Atherosclerosis in Rabbits. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e77037.
- Koch B, Buchholz M, Wermann M, Heiser U, Schilling S, Demuth HU. Probing secondary Glutaminy Cyclase (QC) Inhibitor Interactions applying an In Silico-Modeling/Site-Directed Mutagenesis Approach: Implications For Drug Development. *Chemical biology & drug design*. 2012;80:937-946.
- Kreuzer J, Tiefenbacher C. *Atherosklerose: Taschenatlas Spezial*. 1. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2003.
- Kriegel T, Schellenberger W. Regulation der Enzymaktivität. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Aufl. Heidelberg: Springer; 2014. p. 118.
- Kübler W. Die Wirkung der Digitalisglykoside auf die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-aktivierbare ATPase des Reizleitungssystem und der Arbeitsmuskulatur. In: Jahrmärker H, Hrsg. *Digitalistherapie: Beiträge zu Pharmakologie und Klinik*. 1. Aufl. Heidelberg: Springer; 1975. p. 15.
- Langheinrich AC, Zoerb C, Jajima J, Lommel D, Walker G, Mueller K, et al. Quantification of In-Stent Restenosis Parameters in Rabbits by Micro-CT. *Rofo*. 2005;177(04):501–506.
- Latacz P, Piwowarska W. The role of chemokines in the pathogenesis of restenosis. *Przegl Lek*. 2004;61(9):951-954.
- Lau EK, Paavola CD, Johnson Z, Gaudry JP, Geretti E, Borlat F, et al. Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo. *J Biol Chem*. 2004;279(21):22294-22305.
- Lehr HA, Messmer K. Leukocyte adhesion in atherosclerosis. In: Granger ND, Schmid-Scheenbein G, Hrsg. *Physiologie und Pathophysiologie of Leukocyte Adhesion*. 1. Aufl. New York: Oxford University Press, Inc.; 1995. p. 434-440.
- Leonard EJ, Yoshimura T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today*. 1990;11(3):97-101.
- Libby P. Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am J Cardiol*. 2003;91:3A-6A.

- Liebig HG. Kreislaufsystem. In: Liebig HG, Hrsg. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. 4. Aufl. Stuttgart: Schattauer Verlag GmbH; 2004. p. 133-137.
- Lilly E. Guidance for Assay Development & HTS. 2007 Version 5. National Institutes of Health Chemical Genomics Center; 2007.
- Lorkowski S. Genexpression in den Hauptzelltypen der Gefäßwand. Einfluss koloniestimulierender Faktoren [Diplomarbeit Chemie]. Münster: Westfälische Wilhelms-Universität Münster; 1997.
- Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL et al. Abnormalities in Monocyte Recruitment and Cytokine Expression in Monocyte Chemoattractant Protein 1-deficient Mice. JEM. 1998;187(4):601-608.
- Malle C. Beurteilung der Stenteinheilung mittels Optischer Kohärenztomographie im atherosklerotischen Kaninchenmodell und die Übertragbarkeit auf den Menschen [Dissertation med. vet.]. München: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2013.
- Mehrabian M, Sparkes RS, Mohandas T, Fogelman AM, Lusic AJ. Localization of monocyte chemotactic protein-1 gene (SCYA2) to human chromosome 17q11.2-q21.1. Genomics. 1991;9(1):200-203.
- Meurer DG, Wolf S. Störungen des Lipidstoffwechsels. In: Meurer DG, Wolf S. Allgemeine Pathologie. Kompendium für die Veterinärmedizin. 2. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2007. p. 67-68.
- Meyne K. Ätiologie und Pathogenese. In: Meyne K, Hrsg. Handbuch Arterielle Verschlusskrankheit. Leitfaden zum Krankheitsbild. 1. Aufl. Hannover: Schlütersche GmbH & Co. KG; 2003. p. 17-22.
- Mori E, Komori K, Yamaoka T, Tanii M, Kataoka C, Takeshita A, et al. Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constrictive remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits. Circulation. 2002;105(24):2905-2910.
- Mörl H, Menges HW. Gefäßkrankheiten in der Praxis. 7. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2000.
- Negi SI, Torguson R, Gai J, Kiramijyan S, Koifman E, Chan R, et al. Intracoronary Brachytherapy for Recurrent Drug-Eluting Stent Failure. JACC Cardiovasc Interv. 2016;9(12):1259-1265.
- Neubert A. Entwicklung eines In vitro-Modells zur Untersuchung der Wirkstofffreisetzung und -verteilung aus Arzneistoff-freisetzenden Stents [Dissertation rer. nat.]. Greifswald: Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; 2009.



- Nordestgaard BG, Lewis B. Intermediate density lipoprotein levels are strong predictors of the extent of aortic atherosclerosis in the St. Thomas's Hospital rabbit strain. *Atherosclerosis*. 1991;87(1):39-46.
- Pellegrini DO, Gomes VO, Lasevitch R, Smidt L, Azeredo MA, Ledur P, et al. Efficacy and Safety of Drug-Eluting Stents in the Real World: 8-Year Follow-Up. *Arq Bras Cardiol*. 2014;103(3):174-182.
- Phinikaridou A, Hallock KJ, Qiao Y, Hamilton YA. A robust rabbit model of human atherosclerosis and atherothrombosis. *The Journal of Lipid Research*. 2009;50:787-797.
- Proost P, Struyf S, Couvreur M, Lenaerts JP, Conings R, Menten P, et al. Posttranslational modifications affect the activity of the human monocyte chemotactic proteins MCP-1 and MCP-2: identification of MCP-2(6-76) as a natural chemokine inhibitor. *J Immunol* 1998;160:4034-4041.
- Proudfoot AEI, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, et al. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:1885-1890.
- Reinecke H, Budde T, Breithardt G. Koronare Herzkrankheit. In: Greten H, Rinninger F, Greten T, Hrsg. *Innere Medizin*. 13. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2010. p. 40-44.
- Ribichini F, Joner M, Ferrero V, Finn AV, Crimins J, Nakazawa G, et al. Effects of Oral Prednisone After Stenting in a Rabbit Model of Established Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(2):176-185.
- Riede UN, Werner M, Schaefer HE. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 5. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2004.
- Rogers C, Parikh S, Seifert P, Edelman ER. Endogenous cell seeding. Remnant endothelium after stenting enhances vascular repair. *Circulation*. 1996;94(11):2909-2914.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809.
- Rousseau H, Joffre J, Puel J, Imbert C, Puech JL, Duboucher C, et al. Percutaneous vascular stent: experimental studies and preliminary clinical results in peripheral arterial diseases. *Int Angiol*. 1987;6(2):153-161.
- Ruile-Etzel LJ. Restenose nach Stentimplantation mit und ohne Vordehnung bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung [Dissertation med.]. München: Technische Universität München; 2009.
- Ruiter MS, van Tiel CM, Doornbos A, Marinković G, Strang AC, Attevelt NJ et al. Stents Eluting 6-Mercaptopurine Reduce Neointima Formation and Inflammation while Enhancing Strut Coverage in Rabbits. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138459.

- Ruiz-Carrillo D, Koch B, Parthier C, Wermann M, Dambe T, Buchholz M, et al. Structures of glycosylated mammalian glutaminyl cyclases reveal conformational variability near the active center. *Biochemistry*. 2011;50(28):6280-6288.
- Salam AM, Al Suwaidi J und Holmes DR, Jr. Drug-eluting coronary stents. *Curr Probl Cardiol* 2006; 31(1):8-119.
- Schecter AD, Berman AB, Yi L, Ma H, Daly CM, Soejima K, et al. MCP-1-dependent signaling in CCR2(-/-) aortic smooth muscle cells. *J Leukoc Biol*. 2004;75(6):1079-1085.
- Schepers A, Eefting D, Bonta PI, Grimbergen JM, de Vries MR, van Weel V, et al. Anti-MCP-1 gene therapy inhibits vascular smooth muscle cells proliferation and attenuates vein graft thickening both in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(9):2063-2069.
- Schilling S. Charakterisierung der humanen Glutaminyl-Cyclase im Vergleich mit dem analogen Enzym aus *Carica papaya* [Dissertation rer. nat.]. Halle: Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; 2004.
- Schilling S, Kohlmann S, Bäuscher C, Sedlmeier R, Koch B, Eichentopf R, et al. Glutaminyl cyclase knock-out mice exhibit slight hypothyroidism but no hypogonadism: implications for enzyme function and drug development. *J Biol Chem*. 2011;286(16):14199-14208.
- Schmidt B. Proof of Principle studies. *Epilepsy Res*. 2006;68(1):48-52.
- Schmitz G, Hansen J. Kardiovaskuläres und metabolisches System-Biomarker in Diagnostik und Therapie. In: Schmitz G, Endres S, Götte D, Hrsg. Biomarker. 1. Aufl. Stuttgart: Schattauer GmbH; 2008. p. 95-100.
- Schoon HA, Ellenberger C, Gruber AD. Kreislaufstörungen. In: Baumgärtner W, Gruber AD, Hrsg. Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin. 2. Aufl. Stuttgart: Enke; 2015. p. 120.
- Schwandt P, Parhofer KG. Behandlung von Dyslipoproteinämien. In: Schwandt P, Parhofer KG, Hrsg. Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. 3. Aufl. Stuttgart: Schattauer GmbH; 2007. p. 889-891.
- Schwartz RS, Chronos NA, Virmani R. Preclinical restenosis models and drugeluting stents: still important, still much to learn. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(7):1373-1385.
- Selzman CH, Miller SA, Zimmerman MA, Gamboni-Robertson F, Harken AH, Banerjee A. Monocyte chemotactic protein-1 directly induces human vascular smooth muscle proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(4):H1455-1461.
- Shih YP, Chou CC, Chen YL, Huang KF, Wang AH. Linked production of pyroglutamate-modified proteins via self-cleavage of fusion tags with TEV protease and autonomous N-terminal cyclization with glutaminyl cyclase in vivo. *PLoS One*. 2014;9(4):e94812.

- Siffert W. Essentielle Hypertonie. In: Schneemann H, Young LY, Koda-Kimble MA, Hrsg. Angewandte Arzneimitteltherapie: Klinisch-pharmazeutische Betreuung in Fallbeispielen. 1. Aufl. Heidelberg: Springer; 2001. p. 129.
- Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med.* 1987;316(12):701-706.
- Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland. Fachserie 12, Reihe 4 – 2014.
- Stettler C, Wandel S, Allemann S, Kastrati A, Morice MC, Schömig A et al. Outcomes associated with drug-eluting and bare-metal stents: a collaborative network meta-analysis. *Lancet.* 2007; 370:937–948.
- Stimpel M. Klinische Bedeutung des dauerhaft erhöhten Blutdruckes. In: Stimpel M, Hrsg. Arterielle Hypertonie. Differentialdiagnose und –therapie. 1. Aufl. Darmstadt: Steinkopff Verlag; 2001. p. 50-52.
- Suckow MA. Important biological features. In: Suckow MA, Schroeder V, Hrsg. The laboratory Rabbit. 2. Aufl. Boca Raton: CRC press; 2010. p. 5.
- Suter PF. Erkrankungen der peripheren Blut- und Lymphgefäße. In: Suter PF, Kohn B, Hrsg. Praktikum der Hundeklinik. 10. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2006. p. 573.
- Swanson BN. Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO). *Rev Clin Basic Pharm.* 1985;5(1-2):1-33.
- Takeya M, Yoshimura T, Leonard EJ, Takahashi K. Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Hum Pathol.* 1993;24(5):534-539.
- Tepe G, Duda SH, Hagmeier S, Brehme U, Kalinowski M, Bruck, et al. Plaque morphology after arterial interventions in the New Zealand White Rabbit - Which restenosis model is most suitable? *Rofo.* 1998;168(1):84-89.
- Tocci G, Barbato E, Coluccia R, Modestino A, Pagliaro B, Mastromarino V, et al. Blood Pressure Levels at the Time of Percutaneous Coronary Revascularization and Risk of Coronary In-Stent Restenosis. *Am J Hypertens.* 2016;29(4):509-518.
- Trikalinos TA, Alsheikh-Ali AA, Tatsioni A, Nallamothu BK, Kent DM. Percutaneous coronary interventions for non-acute coronary artery disease: a quantitative 20-year synopsis and a network meta-analysis. *Lancet.* 2009;14;373(9667):911-918.
- Ulfing N. Herz-Kreislauf System und Blut. In: Ulfing N, Hrsg. Kurzlehrbuch Histologie. 3 Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2011. p. 71-72.
- van Andel C, Pistecky PV, Borst C. Mechanical properties of porcine and human arteries: implications for coronary anastomotic connectors. *Ann Thorac Surg.* 2003;76(1):58-65.

- van Coillie E, Proost P, Van Aelst I, Struyf S, Polfliet M, De Meester I, et al. Functional Comparison of Two Human Monocyte Chemoattractant Protein-2 Isoforms, Role of the Amino-Terminal Pyroglutamic Acid and Processing by CD26/ Dipeptidyl Peptidase IV. *Biochemistry* 1998;37:12672-12680.
- van Limburg Stirum J. Allgemeine Physiologie des Säure-Basen Haushalts. In: Van Limburg Stirum J, Hrsg. *Moderne Säure-Basen-Medizin: Physiologie-Diagnostik-Therapie*. 1. Aufl. Stuttgart: Hippokrates Verlag; 2008. p. 13-14.
- Vass Z, Tapaszt I, Polgar J. Die Wirkung der Cholesterin-Dauerfütterung auf den Lipidgehalt der Cornea von Kaninchen. *Albrecht v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthalm.* 1969;178, 306-312.
- Wang ZB, Liu J, Chen SY, Su YS, Xie PY, Fang HC. Correlation of adiponectin, monocyte chemoattractant protein-1, and endothelial function to vascular remodeling in coronary in-stent restenosis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2010;30(4):912-914.
- Wang DS, Ganaha F, Kao EY, Lee J, Elkins CJ, Waugh JM, et al. Local Stent-Based Release of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Limits Arterial In-Stent Restenosis. *J Lab Autom.* 2016;21(2):305-311.
- Watanabe Y, Tsujita Y, Izumi A. WHHL Rabbit. A Heritable Animal Model of Familial Hypercholesterolemia. In: Schettler FG, Gotto AM Jr, Middelhoff G, Habenicht AJR, Jurutka KR, Hrsg. *Atherosclerosis VI. Proceedings of the Sixth International Symposium*. 1. Aufl. Heidelberg: Springer Science&Business Media; 1983. p. 140-143.
- Weyrauch KD, Smollich A, Plendl J. Kreislaufsystem und Blut. In: Weyrauch KD, Smollich A, Plendl J, Hrsg. *Histologie-Kurs für Veterinärmediziner*. 2. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 2009. p. 46-47.
- Wong LM, Myers SJ, Tsou CL, Gosling J, Arai H, Charo IF. Organization and differential expression of the human monocyte chemoattractant protein 1 receptor gene. Evidence for the role of the carboxyl-terminal tail in receptor trafficking. *J Biol Chem*. 1997; 272(2):1038-1045.
- Wonisch M. Pathophysiologie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. In: Pokan R, Benzer W, Gabriel H, Hofmann P, Kunschitz, Mayr K et al., Hrsg. *Kompodium der kardiologischen Prävention und Rehabilitation*. 1. Aufl. Wien: Springer; 2009. p. 40-41.
- World Health Organisation (WHO). *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*. 2011 [zitiert vom 06.07.2016]. Verfügbar unter: URL: <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=15&codcch=834>
- Wu X, Yin T, Tian J, Tang C, Huang J, Zhao Y, et al. Distinctive effects of CD34- and CD133-specific antibody-coated stents on re-endothelialization and in-stent restenosis at the early phase of vascular injury. *Regen Biomater*. 2015;2(2):87-96.

- Xie H, Yang J, Han Y, Zhu X, Fang Q. Inhibition of intimal hyperplasia via local delivery of vascular endothelial growth factor cDNA nanoparticles in a rabbit model of restenosis induced by abdominal aorta balloon injury. *Exp Ther Med*. 2015;10(1):55-61.
- Yang J, Lee IS, Cui F. Sirolimus-loaded CaP coating on Co-Cr alloy for drug-eluting stent. *Regen Biomater*. 2016;3(3):167-171.
- Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Särkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88(12):5252-5256.
- Yoshida T, Sakata K, Nitta Y, Taguchi T, Kaku B, Katsuda S, et al. Short- and long-term benefits of drug-eluting stents compared to bare metal stents even in treatment for large coronary arteries. *Heart Vessels*. 2016;31(5):635-642.
- Zandvliet MJM, Stokhof AA, Boroffka S, van den Ingh T. Intermittent Claudication in an Afghan Hound Due to Aortic Arteriosclerosis *J Vet Intern Med*. 2005;19:259–261.
- Zhou X, Dong J, Zhang L, Liu J, Dong X, Yang Q, et al. Hyperglycemia has no effect on development of restenosis after percutaneous transluminal angioplasty (PTA) in a diabetic rabbit model. *J Endocrinol*. 2015;224(2):119-125.
- Zhu Z, Han H, Zhu J, Zhang J, Du R, Ni J, et al. Safety and efficacy of a novel iopromide-based paclitaxel-eluting balloon following bare metal stent implantation in rabbit aorta abdominalis. *Biomed Mater Eng*. 2015;26(1-2):79-88.

## 9 ANHANG

### 9.1 Materialien

#### 9.1.1 Chemikalien

Acetonitril	Roth, Karlsruhe
4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Agar Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	peqlab, Erlangen
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniak	Roth, Karlsruhe
Biotin	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Bis-Tris Pufferan (BIS-TRIS)	Roth, Karlsruhe
Calciumsulfat	Roth, Karlsruhe
Coomassie-Brilliant-Blau G-250	Biorad, München
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Promega, Mannheim
Dextrose	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dithioerythrit	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
1,4-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	ICN, Aurora (USA)
Glycerin	Roth, Karlsruhe
N-Glutaminyl- $\beta$ -Naphthylamin (Gln- $\beta$ NA)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Kaliumsulfat	Roth, Karlsruhe
Kaliumphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe

---

Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methoxyethylacetat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
N-Ethylmaleimide	Roth, Karlsruhe
Pepton	Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure 85 %	Roth, Karlsruhe
Protease Inhibitor-Tabletten complete Mini (PI)	Roche Diagnostics, Mannheim
Pyroglutamyl-Aminopetidase (pGAP)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Sorbitol	Roth, Karlsruhe
Trishydroxymethyl-Aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Tris(2-carboxyethyl)phosphine	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Trypton	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tween 80	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tris base	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Xylol	Roth, Karlsruhe
YNB	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

### 9.1.2 Puffer

Aufschlusspuffer:	10 mM TRIS pH 7,5
	100 mM NaCl
	5 mM EDTA
	0,5 % Triton X-100
	10 % Glycerin
Messpuffer HPLC:	25 mM MOPS pH 7,0

Puffer zur Proteinaufkonzentrierung	25 mM BIS-TRIS, pH 6,8 100 mM NaCl 2 mM EDTA 2 mM Dithioerythrit
Proteaseinhibitormix:	1 Tablette Proteaseinhibitor-Mix 10 ml Aufschlusspuffer 10 µl 1 M 4-(2-Aminoethyl)- benzensulfonylfluorid
Triton X-100-Puffer, 9% (w/w):	9 g Triton X-100 ad 100 ml doppelt destilliertes Wasser (ddH <sub>2</sub> O)

#### Agarosegelelektrophorese

50X TAE Puffer	242 g Tris Base 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
0,8 % Agarose	0,8 g Agarose 100 ml 1X TAE Puffer 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

### 9.1.3 Zellen und Vektoren

Hep-G2	DSMZ, Braunschweig
SH-SY5Y	DSMZ, Braunschweig
<i>E. coli</i> DH5α	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
<i>P. pastoris</i> X-33	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
pPICZαA	Invitrogen, Groningen (Niederlande)

### 9.1.4 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur

Casy ton	Roche Diagnostics, Mannheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	life technologies, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FBS)	life technologies, Darmstadt



Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	life technologies, Darmstadt
RPMI	life technologies, Darmstadt
Trypsin	life technologies, Darmstadt

### 9.1.5 Primer und Plasmid

Das benötigte Gen der rQC wurde durch die Firma GenScript (Piscataway, USA) synthetisiert, in den Vektor pUC57 kloniert und bei -20 °C gelagert.

Die Primer (siehe Tbl. 17) wurden bei Metabion International AG (Steinkirchen) hergestellt und gefriergetrocknet geliefert. Nachdem die DNA mit der vorgegebenen Menge destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) in Lösung gebracht wurde, betrug die Stammlösung 100 µM. Diese wurde auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt und ebenfalls bei -20 °C gelagert.

**Tbl. 17:** Benötigte Primer mit Sequenzen.

Bezeichnung	Sequenz
rQC	Forward : 5' -ATATCTCGAGAAAAGACATCACCATCA CCATCACGTCAGTCGAGGCGCCGCAG -3' Reverse : 5' - ATATGCGGCCGCTCAGAATGACAAATGCAG -3'
rCCL2	Forward : 5' -CAA CAA GAC CAT CTC AGT G-3' Reverse : 5' -CCG GGT GGA AGA TAA ATT AG-3'
rHPRT	Forward : 5' -TGC TGA CCT GCT GGA TTA TA-3' Reverse : 5' -CTT GAC CAA GGA AAG CAA G-3'
rQPCT	Forward : 5' -GCA GAA GGC ACA AGT ATT TC-3' Reverse : 5' -CAT AGG GCG TGT TAC TCA A-3'
rQPCTL	Forward : 5' -AGC CGA GCT CGC CGC TCA A-3' Reverse : 5' -TGC AGG TCC AAC TGC CCC A-3'
rYWHAZ	Forward : 5' -AGC AGG CCG AGC GGT ATG AT-3' Reverse : 5' -CTC AGC ACC TTC GGT CTT T-3'

### 9.1.6 Enzyme und Puffer

10X 3.1 Buffer	NEB, Ipswich (USA)
10X CutSmart Buffer	NEB, Ipswich (USA)
10X Ligase Buffer	Promega, Mannheim
5X Phusion HF Buffer	NEB, Ipswich (USA)

GoTag DNA Polymerase	Promega, Mannheim
GoTag Reaction Buffer	Promega, Mannheim
Not I HF	NEB, Ipswich (USA)
Phusion DNA Polymerase	NEB, Ipswich (USA)
Pme I	NEB, Ipswich (USA)
Superscript II RT	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
SYBR Green	Qiagen, Düsseldorf
T4 DNA Ligase	Promega, Mannheim
Xho I	NEB, Ipswich (USA)

### 9.1.7 Kits und ELISA

CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay	Promega, Mannheim
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Rabbit MCP-1 ELISA Kit	Cusabio, Wuhan (China)
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen, Düsseldorf

### 9.1.8 Nährmedien für Hefen und Bakterien

Die verwendeten Medien wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die Zusammensetzung ist nachfolgend angegeben.

BMGY-Medium	10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, ad 700 ml ddH <sub>2</sub> O. Autoklavieren, auf Raumtemperatur (RT) abkühlen lassen, 100 ml 1 M Kaliumphosphat (pH 6,0), 100 ml 10x YNB (13,4 %), 2 ml 500x Biotin (0,02 %), 100 ml 10x Glycerin (10%)
BMMY-Medium	10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, ad 700 ml ddH <sub>2</sub> O. Autoklavieren, auf RT abkühlen

	lassen, 100 ml 1M Kaliumphosphat (pH 6,0), 100 ml 10x YNB (13,4 %), 2 ml 500x Biotin (0,02 %), 100 ml 10x Methanol (5 %)
Fermentationsmedium	1,86 g Calciumsulfat 36,4 g Kaliumsulfat 29,8 g Magnesiumsulfat 8,26 g Kaliumhydroxid 53,4 ml Phosphorsäure (85 %) 80 g Glycerin ad 2l ml ddH <sub>2</sub> O
LB-Medium/Agar	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 15 g Agar Agar, ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O
YPD-Medium/Agar	10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 20 g Agar Agar, ad 900 ml ddH <sub>2</sub> O, autoklavieren, abkühlen bis 60 °C, 100 ml 10x Dextrose (20%)
YPDS-Medium/Agar	10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 182,2 g Sorbitol, 20 g Agar Agar, ad 900 ml ddH <sub>2</sub> O, autoklavieren, abkühlen bis 60 °C, 100 ml 10x Dextrose (20 %)
Zeocin	Duchefa Biochemie, Haarlem
[25 µg/ml in <i>E. coli</i> ; 100 µg/ml in <i>P. pastoris</i> ]	(Niederlande)

### 9.1.9 Cholesterin- und LDL-Messungen

Cholesterin FS*	DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim
LDL Fällungsreagenz	DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim
Lipidstandard TruCal	DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim

### 9.1.10 Geräte und Zubehör

#### Elektrophorese

Agarose-Elektrophoresekammer	OWL Separation Systems, Rochester (USA)
BioDoc-It Imaging System	AL-Labortechnik, Amstetten
Electrophoresis Power Supply EPS 301	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Power PAC 300	Biorad, München
Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophoresekammer	Biorad, München
Marker Gene Ruler 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
6x Loading Dye Purple	NEB, Ipswich (USA)

#### Inkubatoren

Inkubator B6 Funktion line	Heraeus, Hanau
Inkubator IR Safe	Sanyo, Leicestershire (UK)
New Brunswick Innova 4400 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison (USA)

#### PCR-Geräte

iCycler	Biorad, München
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg

#### Spektralphotometer

Smart Spec 3000	BIO-RAD, Hercules (USA)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Spectralfluor Plus Absorbance Micro Plate reader	Tecan, Männedorf (Schweiz)
UV-Vis NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

#### Zentrifugen

Beckmann Allegra 21	Beckmann-Coulter, Krefeld
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifugen Beckmann Avanti J-20 und J-30I	Beckmann Coulter, Krefeld
Sigma Laborzentrifuge 4-15	Sigma, Steinheim
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg

#### Mikroskope

Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg
Axiovert S25	Zeiss, Oberkochen

Axiovert S100	Zeiss, Oberkochen
<u>Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (HPLC)</u>	
Autosampler-L-7200	Merck, Darmstadt
Entgaser: Vacuum degasser Series 200	Perkin-Elmer, Massachusetts
Homogenisator: Precellys 24	Bertin Corp, Rockville, USA
HPLC	Merck, Darmstadt
Magnetrührer: MR Hei-Standard	Heidolph Instruments, Schwabach
RP18-Säule (Korngröße: 5 µM)	Altmann Analytik, München
<u>Sonstiges</u>	
Aktivitätsmessung: FLUOstar Optima	BMG Labtech, Ortenberg
Amicon Rührzelle 8050, 50 ml	Merck Millipore, Darmstadt
Zellzählung: Casy Model DT	Schärfe Systems, Reutlingen
Elektroporator: GenePulser Xcell	Biorad, München
Feinwaage	Mettler-Toledo, Gießen
Fermenter: BIOSTAT B, 5 l	Sartorius BBI Systems GmbH, Göttingen
Heizblock: Dri-Block DB20	Techne, Staffordshire (UK)
Laborwaage: LP3200 D	Sartorius, Göttingen
Nephelometer: Nephelo Star Plus	BMG Labtech, Ortenberg
Sterilbank: Biowizard	Kojair Tech Oy, Vilppula (Niederlande)
Schüttler: Infors HT Multitron	Infors AG, Bottmingen (Schweiz)
Schüttler: KS-15/TH-15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Ultrafiltrations-Membranscheiben, 10 kDa	Merck Millipore, Darmstadt
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia (USA)
Wasserbad	Grant, Cambridgeshire (UK)
Wasserdeionisationsanlage: Milli-Q Gradient	Millipore, Billerica (USA)
<u>verwendete Geräte im Tierversuch</u>	
scil Vet ABC	Scil, Gurnee (USA)
ABL800 FLEX Blutgasanalysator	Radiometer, Willich
C-Bogen: Ziehm Vision	Ziehm Imaging GmbH, Nürnberg
Inhalationsnarkosegerät: Dräger Primus	Dräger, Lübeck
Patientenüberwachung: Dräger Infinity Delta	Dräger, Lübeck

Monitor

Histologie

Einbettformen	Heraeus Kulzer, Wehrheim
Klebepresse	Exakt, Norderstedt
Kunststoffobjektträger	Walter Messner GmbH, Oststeinbek
Mikrometerschraube	Wabeko, Neu-Ulm
Schleifgerät	Exakt, Norderstedt
SIC-Nass-Schleifpapier 1200, 2400, 4000	Heraeus Kulzer, Wehrheim
Technovit 9100	Heraeus Kulzer, Wehrheim
Technovit 7200 VLC	Heraeus Kulzer, Wehrheim
Trennschleifgerät	Exakt, Norderstedt

**9.1.11 Histologische Einbettung****Tbl. 18:** Zusammensetzung der Lösung für die Einbettung in Technovit 9100.

<b>Lösung</b>	<b>Mischverhältnis/Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
Xylol/ Technovit 9100 Basisflüssigkeit	(stabil) 1:1	Roth, Karlsruhe/ Heraeus Kulzer, Wehrheim
Präinfusionslösung I	200 ml stabile Basislösung + 1 g Härter 1	Heraeus Kulzer, Wehrheim
Präinfusionslösung II	200 ml entstabilisierte Basislösung + 1 g Härter 1	Heraeus Kulzer, Wehrheim
Polymerisationslösung	9 Teile Stammlösung A 1 Teil Stammlösung B	Heraeus Kulzer, Wehrheim
Stammlösung A	500 ml entstabilisierte Basislösung 80 g PMMA-Pulver 3 g Härter	Heraeus Kulzer, Wehrheim
Stammlösung B	50 ml entstabilisierte Basislösung 4 ml Härter 2 2 ml Regler	Heraeus Kulzer, Wehrheim

Das Entstabilisieren der Basislösung erfolgt mittels Durchlauf durch eine Chromatographiesäule mit  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Füllung.

### 9.1.12 Modifizierte Movat-Pentachrom Färbung nach VERHOEFF

**Tbl. 19:** Lösungen und Zusammensetzungen der modifizierten Movat-Pentachrom Färbung nach VERHOEFF.

Verwendete Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller
Alcianblau 8 GS (1 %)	1 g Alcianblau ad 100 ml 1 % Essigsäure	Flutra, Buchs
Working Hematoxylin-Lösung (Lösung ist 8 Tage haltbar)	30 ml 10 % alkoholisches Hämatoxylin (muss mindes- tens 7 Tage reifen) - 10 g Hämatoxylin - 100 ml 100 % Ethanol 30 ml 96 % Ethanol 30 ml 10 % Eisen-III-Chlorid - 10 g Eisen-III-Chlorid - 100 ml ddH <sub>2</sub> O 30 ml Verhoeff's Jod-Lösung - 2 g Jodkristalle - 4 g Kaliumiodid - 100 ml ddH <sub>2</sub> O	AppliChem, Darmstadt  Merck, Darm- stadt  VEB Feinchemie, Sebnitz
2 % Eisen-III-Chlorid (wässrig)	2 g Eisen-III-Chlorid 100 ml ddH <sub>2</sub> O	Merck, Darm- stadt
5 % Natriumthiosulfat (Natriumthiosulfat-Pentahydrat)	5 g Natriumthiosulfat 100 ml ddH <sub>2</sub> O	Merck, Darm- stadt
Woodstain-Scarlet-Working Solution	80 ml Lösung „A“ - 0,1 g Crocein Scarlet - 99,5 ml ddH <sub>2</sub> O - 0,5 ml Eisessig 20 ml Lösung „B“ - 0,1 g Säurefuchsin - 99,5 ml ddH <sub>2</sub> O - 0,5 ml Eisessig	Flutra, Buchs  Merck, Darm- stadt
5 % Phosphowolframsäure (Wolf- ramatophosphorsäurehydrat)	5 g Phosphowolframsäure 100 ml ddH <sub>2</sub> O	Merck, Darm- stadt
96 % Ethanol 100 % Ethanol		Sigma-Aldrich, Stehheim
Alkoholische Safran-Lösung (Safran du Gatinais)	6 g Safran du Gatinais 100 ml 100 % Ethanol	Waldeck, Müns- ter
0,5 % Essigsäure	0,5 ml Eisessig 99,5 ml ddH <sub>2</sub> O	Rotipuran, 100 %, Roth

### 9.1.13 Giemsa-Färbung

**Tbl. 20:** Lösungen und Zusammensetzungen der Giemsa-Färbung.

Verwendete Lösungen	Hersteller
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck, Darmstadt
100 % Essigsäure	Merck, Darmstadt
70 % Ethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

### 9.1.14 Behandlungssubstanzen und Medikamente

Aspirin Migräne Brausetabletten, 500 mg	Bayer, Bitterfeld-Wolfen
Baytril 5 %	Bayer, Bitterfeld-Wolfen
Budair 200 µg	Chiesi, Hamburg
Cepetor 1 mg/ml	cp-pharma, Burgdorf
Dimazon 50 mg/ml	MSD, New York (USA)
Heparin-Natrium-25000 (1:4 verdünnt mit NaCl)	ratiopharm, Ulm
Isofluran CP 1 ml/ml	cp-pharma, Burgdorf
Ketamin 100 mg/ml	cp-pharma, Burgdorf
Melosolute 5 mg/ml	cp-pharma, Burgdorf
Methocel E5 Premium LV Hydroxypopyl	Colorcon, Dartford
Methylcellulose	
MWT-S-17, 1-(3-(1H-imidazol-1yl)	Synthon Chemicals GmbH & Co. KG,
propyl)-3(3,4-dimethoxyphenyl)thiourea	Wolfen
Prednison	Sigma-Aldrich, Steinheim
SalbuHEXAL® N Dosieraerosol 100 µg /Dosis	Hexal, Holzkirchen
Thilo-Tears Gel 3 mg/g	Alcon, Fort Worth (USA)
Xylocain 2 %	AstraZeneca, London (UK)

### 9.1.15 Operationsmaterialien

Coroflex 3,0 mm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
ETHICON * VICRYL* 2/0	Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt

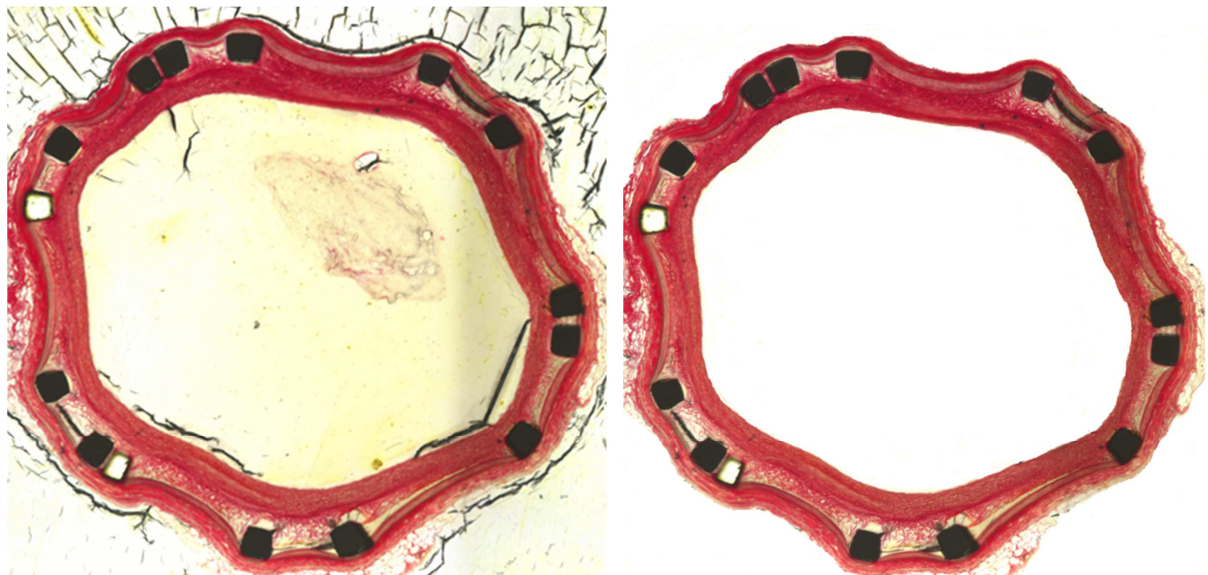


HI-TORQUE Guide Wires, 0,014", J-Tip Shape	Abbott Vascular Deutschland GmbH, Wetzlar
Inflationsspritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Injection Cap	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Monosyn 3/0	B.Braun Aesculap AG, Tuttlingen
RADIFOCUS INTRODUCER II, 5 Fr.	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn
RADIFOCUS GUIDE WIRE M, 0.035"	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn
RÜSCH Safetyclear Endotrachealtubus	Rüsch, Kernen
SeQuent Neo 2,5 mm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
VasoVet, 0,7 x 19 mm	B.Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen

## 9.2 Bearbeitung der histologischen Bilder

Alle abgebildeten Gefäßquerschnitte der morphometrischen Auswertung wurden mit dem Programm GIMP 2.8.16 bearbeitet um die Artefakte im Hintergrund, die durch die Technoviteinbettung entstanden sind, zu entfernen. Gefäßgewebe wurde nicht verändert.

In Abbildung 33 sind Originalaufnahme und bearbeitete Version gegenübergestellt.



**Abb. 33: Vergleich von originalem und bearbeitetem Foto eines histologischen Stentquerschnitts. Movat Pentachrom, 40fach.**

### 9.3 Kleine Blutbilder

**Tbl. 21:** Ergebnisse der kleinen Blutbilder von 28 weiblichen Weißen Neuseelandkaninchen im Alter von 14 Wochen.

Tier	WBC 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	RBC 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	HGB g/dl	HCT %	MCV μm <sup>3</sup>	MCH pg	MCHC g/dl	LYM %	MO %	GRA %
1	7,2	9,8	21,5	67,8	69	21,9	31,7	77	2,1	20,9
2	7,3	9,41	21,1	63,6	68	22,5	33,2	71,2	1,7	27,1
3	4,7	8,82	22,2	66,9	76	25,2	33,2	62,7	1,5	35,8
4	7,9	8,15	19,1	57,5	71	23,4	33,2	76,3	0,9	22,8
5	8,1	6,57	15,1	46,3	70	22,9	32,6	70,3	3,4	26,3
6	8,6	6,38	15,5	44,5	70	24,3	34,8	78,4	1,9	19,7
7	7,9	6,9	14,8	46	67	21,5	32,2	79	2,3	18,7
8	8,1	9,26	21,5	65	70	23,3	33,1	77,8	1,7	20,5
9	7,5	10,37	24,9	>70	71	24	33,7	57,1	2,4	40,5
10	5,9	10,03	24,8	>70	72	24,7	34,3	57,6	1,6	40,8
11	8	11,16	>25	>70	72	23,9	33,3	62,6	1,4	36
12	5,6	7,24	17,5	52,7	73	24,1	33,1	64,3	2,1	33,6
13	5,4	10,64	>25	>70	71	23,5	33,3	68,3	1,5	30,2
14	5,9	9,4	22,3	65,5	70	23,7	34	70	2	28
15	8,9	9,69	22	67,5	70	22,7	32,5	64,7	1,7	33,6
16	6,3	9	20,7	62,6	70	23	33	58,6	2,4	39
17	5,1	5,88	14,4	41,6	71	24,5	34,6	74,5	1,8	23,7
18	11,3	8,26	18,3	54,1	65	22,2	33,9	77,2	1,5	21,3
19	7,1	8,01	18,5	55,5	69	23,1	33,4	69	2,7	28,3

# ANHANG

20	6,5	8,94	18,9	57,6	64	21,2	32,8	77,7	1,5	20,8
21	7,9	7,67	17,7	51,4	67	23,1	34,4	77,1	1,9	21
22	7,5	7,95	18,7	56	70	23,5	33,3	77,4	1,8	20,8
23	9,1	6,91	15,9	46,7	68	23	34,1	77,6	1,9	20,5
24	6,4	9,27	20,4	62,6	68	22	32,6	75	2	23
25	7,4	6,42	15	45,2	70	23,4	33,2	69,7	1,8	28,5
26	7,2	7,01	16,5	49,2	70	23,5	33,5	69,8	2,4	27,8
27	7,2	6,14	13,9	41,1	67	22,6	33,7	77,5	1,6	20,9
28	9,6	6,77	15,6	47,3	70	23,1	33	83,3	1,5	15,2
<b>Referenz Scil Vet ABC</b>	6,3-10	5,2-6,8	11,5-15,1	36-47	65-76	21,1-24,5	29,5-33,9	-	-	-
<b>Referenz SUCKOW et al.</b>	5,1-9,7	5,3-6,8	9,8-14	34-43	60-69	20-23	31-35	39-68	1,0-9,0	25-46

Werte über dem Referenzbereich sind **blau** dargestellt, Werte die nach unten abweichen **rot**

WBC:	Leukozyten
RBC:	Erythrozyten
HGB:	Hämoglobin
HCT:	Hämatokrit
MCV:	Mittleres korpuskuläres Volumen
MCH:	mittlere korpuskuläre Hämoglobinmenge eines Erythrozyten
MCHC:	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
LYM:	Lymphozyten
MO:	Monozyten
GRA:	Granulozyten

**Tbl. 22:** Ergebnisse der kleinen Blutbilder von 14 weiblichen Weißen Neuseelandkaninchen im Alter von 22 - 24 Wochen nach operativer Sten-  
timplantation und 28 Tagen Cholesterindiät.

Tier	WBC 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	RBC 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	HGB g/dl	HCT %	MCV μm <sup>3</sup>	MCH pg	MCHC g/dl	LYM %	MO %	GRA %
5	7,5	3,91	10,8	28,2	72	27,7	38,3	75,8	2,4	21,8
9	2,6	3,84	10,4	29,5	77	27	35,1	75	1,8	23,2
10	6,2	6,34	16,3	46,7	74	25,8	35	76,1	2,3	21,6
11	1,3	2,23	4,9	16,6	74	21,9	29,5	77,4	1,6	21
12	3,3	4,54	10,2	31,6	70	22,4	32,3	69	2,9	28,1
13	4,3	2,6	7	18,4	71	27,1	38,1	73,9	1,9	24,2
14	12,9	5,45	14,3	39,2	72	26,3	36,5	73,3	1,7	25
18	5,3	2,96	3,3	19,8	67	11,1	16,6	93,5	0,6	5,9
19	0,5	4,05	7,5	28,3	70	18,6	26,6	-	-	-
20	5,1	5,92	10,9	38,8	66	18,4	28,1	40,2	2,2	57,6
21	6,5	6,61	15,4	48,7	74	23,4	31,7	49,4	2,2	48,4
23	7	4,74	11,5	35,4	75	24,3	32,7	53,6	1,7	44,7
24	9	4,8	12,5	33,2	69	26,1	37,7	58,3	2,6	39,1
25	1,3	1,81	5,1	13,4	74	28,3	38,1	79,8	1,9	18,3
<b>Referenz scil Vet ABC</b>	6,3-10	5,2-6,8	11,5-15,1	36-47	65-76	21,1-24,5	29,5-33,9	-	-	-
<b>Referenz SUCKOW et al.</b>	5,1-9,7	5,3-6,8	9,8-14	34-43	60-69	20-23	31-35	39-68	1,0-9,0	25-46

Legende: siehe Tbl. 21

## 9.4 Scoresheet

Beobachtungen	Punktwertung
<b>I Körpergewicht</b>	
Unbeeinflusst oder Anstieg	0
Reduktion um $\leq 10\%$	1 - 10
Reduktion zwischen 11 - 15 %	11 - 15
Reduktion zwischen 16 - 19 %	16 - 19
Reduktion um $\geq 20\%$	20
<b>II Allgemeinzustand</b>	
Fell glatt, glänzend, anliegend; Körperöffnungen sauber	0
Fell stumpf, gesträub; Augen trüb	1-5
verklebte oder feuchte Körperöffnungen struppiges ungepflegtes Fell; unphysiologische Haltung	6-10
deutlich verstärkte Atemgeräusche mit abdominaler Atmung	20
<b>III Spontanverhalten</b>	
physiologisches Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte)	0
ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik, Isolation	1-5
Apathie, Schmerzáußerungen	6-10
Stereotypien, Koordinationsstörungen	11-15
Automutilation (z.B. Annagen von Zehen)	20
Einstellen der Caecotrophie	20
<b>IV Physiologische Parameter</b>	
Futteraufnahme	Ja, Menge physiologisch: 0
Heuaufnahme	
Wasseraufnahme	Reduziert: 1-10
Kotabsatz	Nein: 11-15
Harnabsatz	Nein > 24 h: 20
<b>V Verfahrensspezifische Kriterien</b>	
motorische Auffälligkeit: Tier vermeidet Bewegungen/ Bewegungen sind verlangsamt	1-5
Durchfall, wenn schwächend oder andauernd	6-10
Temperaturen über 41 °C für länger als 24 h	6-10
Temperaturen unter 37 °C für länger als 12 h	6-10
Cholesterinausfällungen in der Iris	10

Narbe entzündet (geschwollen, rot, feucht, schmerzhaft)	10-15
Xanthombildung (Hautverdickungen va. Kinn und Lippen)	10-15
Verzögerte Wundheilung (Hals), mit Schmerzen einhergehend	15-20
Lahmheit der Hintergliedmaße(n)	15-20
Hautveränderungen/ Atrophie an den Pfoten	15-20
<b>Bewertung, Maßnahmen</b>	<b>Punktsumme</b>
<u>keine Belastung</u>	0
<u>geringe Belastung</u> : sorgfältig weiter beobachten (1x tägl. zusätzlich zu festgelegten Intervallen), evtl. unterstützende Maßnahmen (z.B. Wärmezufuhr, Spezialfutter)	5-9
<u>mittlere Belastung</u> : ggf. medizinische Versorgung einleiten (Analgesie, Antibiotikum, usw.) länger andauernd als 72 h gilt als schwere Belastung	10-19
<u>schwere Belastung</u> : Tierschutzbeauftragten konsultieren; tierärztliche Versorgung einleiten; ggf. Tier euthanasieren	≥ 20
<u>Humaner Endpunkt</u> : Sofortiger Abbruch mit Euthanasie des Tieres	> 30 20 > 2 Tage

1. Beobachtungsintervalle:
  - die ersten 3 Tage post-operativ: 2x täglich
  - Tag 4-14 post-operativ: 1x täglich
  - die ersten 2 Wochen des Versuchs (Futterumstellung) und ab der 3. Woche post-operativ: 2x wöchentlich
2. Messung der Rektaltemperatur:
  - die ersten 3 Tage post-operativ: morgens und abends
  - Tag 4-14 post-operativ: 1x täglich
  - die ersten 2 Wochen des Versuchs und ab der 3. Woche post-operativ: 2x wöchentlich
3. Messung des Körpergewichtes:
  - die erste Wochen post-operativ: 1x täglich
  - die ersten 2 Wochen des Versuchs und ab der 2. Woche post-operativ: 2x wöchentlich
4. Belastungsscore/Abbruchkriterien:  
Punktzahl (0-20) wird pro Zeile 1x vergeben sobald ein Kriterium erfüllt ist. Auch bei mehreren positiven Befunden pro Zeile kommt es zu keiner Addition der Punkte pro Zeile.

## 9.5 Analytik der Pharmakokinetikstudie

**Tbl. 23:** PK mit MWT-S-17 nach 2 Wochen Cholesterindiät, Tier A, B, C nach *i.v.* Applikation.

MWT-S-17 PK1	Tier A	Tier B	Tier C	MW	SD
$c_{\max}$ in ng/ml	1340	1260	954	1185	203,7
$t_{\max}$ in h	0,58	0,48	0,50	0,52	0,05
AUC in (ng*h)/ml	1690	1546	1417	1551	136,7
$t_{1/2}$ in h	0,851	0,864	1,845	1,187	0,570
F in %*	76,54	70,00	64,16	70,24	6,19

\* Die Bioverfügbarkeit wurde im Vergleich zur *i.v.* Gruppe mit den Tieren der *p.o.* Gruppe D, E und F errechnet

$c_{\max}$ : Maximale Blut- bzw. Serumkonzentration

$t_{\max}$ : Zeitpunkt, zu dem  $C_{\max}$  erreicht wird

AUC: Fläche unter der Konzentration-Zeit-Kurve

$t_{1/2}$ : Halbwertszeit, Zeit in der die Konzentration um die Hälfte verringert wird

F: absolute Bioverfügbarkeit, Anteil des Wirkstoffes der im systemischen Kreislauf zur Verfügung steht

MW: Mittelwert

SD: Standardabweichung

**Tbl. 24:** PK mit MWT-S-18 nach 2 Wochen Cholesterindiät, Tier G, H, I nach *i.v.* Applikation.

MWT-S-18 PK1	Tier G	Tier H	Tier I	MW	SD
$c_{\max}$ in ng/ml	28	131	158	106	68,6
$t_{\max}$ in h	0,5	0,48	0,5	0,49	0,01
AUC in (ng*h)/ml	84	199	162	148	59,0
$t_{1/2}$ in h	1,587	1,314	0,571	1,157	0,526
F in %*	3,38	8,05	6,56	6,00	2,39
F in %**	0,96	2,26	1,89	1,70	0,67

\* Die Bioverfügbarkeit wurde im Vergleich zur *i.v.* Gruppe mit den Tieren der *p.o.* Gruppe K und L errechnet (Serumkonzentrationen von MWT-S-18 waren in den Proben von J ca. 20 mal höher als die der beiden anderen Tiere, so dass von einer Probenverunreinigung ausgegangen werden musste)

\*\* Die Bioverfügbarkeit wurde im Vergleich zur *i.v.* Gruppe mit den Tieren der *p.o.* Gruppe J, K und L errechnet

Legende: siehe Tbl. 23

**Tbl. 25:** PK mit MWT-S-17 nach 6 Wochen Cholesterindiät, Tier A, B, C nach *i.v.* Applikation.

<b>MWT-S-17 PK2</b>	<b>Tier A</b>	<b>Tier B</b>	<b>Tier C</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>
$c_{\max}$ in ng/ml	950	2050	182	1061	938,9
$t_{\max}$ in h	1	0,5	3	1,50	1,32
AUC in (ng*h)/ml	2065	3733	597	2132	1569,0
$t_{1/2}$ in h	1,119	1,097	1,784	1,334	0,391
F in %*	99,76	180,36	28,85	102,99	75,80

\* Die Bioverfügbarkeit wurde im Vergleich zur *i.v.* Gruppe mit den Tieren der *p.o.* Gruppe D, E und F errechnet

Legende: siehe Tbl. 23

**Tbl. 26:** PK mit MWT-S-18 nach 6 Wochen Cholesterindiät, Tier G, H, I nach *i.v.* Applikation.

<b>MWT-S-18 PK2</b>	<b>Tier G</b>	<b>Tier H</b>	<b>Tier I</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>
$c_{\max}$ in ng/ml	120	73,2	420	204	188,2
$t_{\max}$ in h	0,5	0,62	0,2	0,44	0,22
AUC in (ng*h)/ml	210	128	379	239	127,9
$t_{1/2}$ in h	1,200	1,312	1,118	1,210	0,097
F in %*	13,80	8,45	24,94	15,73	8,41

\* Die Bioverfügbarkeit wurde im Vergleich zur *i.v.* Gruppe mit den Tieren der *p.o.* Gruppe J, K und L errechnet

Legende: siehe Tbl. 23



## 9.6 Biochemische *ex vivo* Untersuchungen

### 9.6.1 Berechnung der QC-spezifischen Aktivität

**Tbl. 27:** Ergebnisse der spezifischen QC-Aktivitäten in nM/min.

Behandlungsgruppe	Messung	Steigung in $\frac{A}{nM}$	Spezifische Aktivität in $\frac{nM}{min}$
Vehikel Pool 1 (Tier: 12, 18)	1	53,771	3,723
	2	65,719	4,551
	3	161,56	11,187
Vehikel Pool 2 (Tier: 21, 25)	1	53,835	3,728
	2	72,989	5,054
	3	69,929	4,842
Prednison (Tier: 11,20)	1	89,653	6,208
	2	209,24	14,488
	3	181,69	12,581
Niedrige QC-Inhibitor- Konzentration Pool 1 (Tier: 10, 13)	1	81,949	5,674
	2	63,323	4,385
	3	75,634	5,237
Niedrige QC-Inhibitor- Konzentration Pool 2 (Tier: 19, 23)	1	36,997	2,562
	2	29,786	2,062
	3	43,761	3,030
Hohe QC-Inhibitor- Konzentration Pool 1 (Tier: 5, 9, 14)	1	-104,3	0*
	2	-83,967	0*
	3	64,96	4,498

Berechnung nach Formel (XI)

\*Negative Beträge entsprachen keiner messbaren Aktivität im Gefäß und wurden gleich 0 gesetzt

### 9.6.2 Vergleich der spezifischen QC-Aktivität.

**Tbl. 28:** Ergebnisse der spezifischen QC-Aktivitäten in nmol/mg\*min.

Behandlungsgruppe	Messung	Konzentration der Aufschlussfraktion im Ansatz in $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$	Spezifische Aktivi- tät in $\frac{\text{nmol}}{\text{mg} \cdot \text{min}}$
Vehikel Pool 1 (Tier: 12, 18)	1	0,3436	0,0108
	2		0,0132
	3		0,0326
Vehikel Pool 2 (Tier: 21, 25)	1	0,5208	0,0072
	2		0,0097
	3		0,0093
Prednison (Tier: 11,20)	1	0,5059	0,0123
	2		0,0286
	3		0,0249
Niedrige QC-Inhibitor- Konzentration Pool 1 (Tier: 10, 13)	1	0,4633	0,0122
	2		0,0095
	3		0,0113
Niedrige QC-Inhibitor- Konzentration Pool 2 (Tier: 19, 23)	1	0,4999	0,0051
	2		0,0041
	3		0,0061
Hohe QC-Inhibitor- Konzentration Pool 1 (Tier: 5, 9, 14)	1	0,4488	0*
	2		0*
	3		0,01

Berechnung nach Formel (XII)

\*Negative Beträge entsprachen keiner messbaren Aktivität im Gefäß und wurden gleich 0 gesetzt

### 9.6.3 Quantitative Echtzeit-PCR

**Tbl. 29:** Darstellung der Referenz- und normierten Zielgen „comparative concentrations“ (cc) der qRT-PCR nach ihren Behandlungsgruppen.

Behandlung	cc	Cc (Zielgen, normiert)		
	(Ref.2G)	rCCL2	rQPCT	rQPCTL
Ungestentet, Unbehandelt	1	1	1	1
Stent, Unbehandelt				
12	2,031	0,552	0,442	1,463
18	0,314	0,459	1,139	0,705
21	0,400	0,473	0,803	0,390
25	2,644	0,246	0,071	0,112
Prednison				
20	0,118	0,286	0,781	1,245
Niedrige QC-Inhibitor-Konzentration				
10	0,616	0,617	0,997	1,445
13	0,276	1,707	0,714	0,899
19	1,010	1,100	0,716	1,674
23	0,702	0,571	1,425	1,795
Hohe QC-Inhibitor-Konzentration				
5	0,932	2,672	1,481	0,850
9	0,576	1,129	0,730	0,407

Die Werte der Referenzgene (HPRT und YWHAZ) wurden gemittelt (Ref.2G)

Die ungestentete Arterie des unbehandelten Tieres diente als Kalibrator (= 100 %)

Die drei Zielgene, deren Genexpressionen gemessen wurden, sind gegen die Referenzgene normiert dargestellt worden

Proben der Tiere 11 und 14 fehlen, da keine ausreichend hohe RNA-Konzentration isoliert werden konnte

## DANKSAGUNG

Mein Dank gilt **Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth** für die Bereitstellung und Finanzierung dieses interessanten Themas.

**Prof. Dr. Gerhard Oechtering** danke ich für die Betreuung und die Übernahme des Gutachtens.

Ebenfalls für die Anfertigung des Gutachtens danke ich **Prof. Dr. Stephan von Hörsten**.

Insbesondere möchte ich auch **Dr. Holger Cynis** ganz herzlich für die kompetente fachliche Unterstützung danken, die ich jederzeit einholen konnte.

Mein allerherzlichster Dank gilt **Dr. Björn Nitzsche** für die chirurgische Hilfestellung bei den Operationen, das daraus folgende Selbstvertrauen sowie die immerwährende gute Laune, durch die selbst die längsten Versuchstage immer mit Spaß zu Ende gingen.

**Katrin Schulz** danke ich für die Heranführung an alle mir bis dahin unbekannten biochemischen Methoden.

Für die Auswertung und Probenbearbeitung der Pharmakokinetikstudie, vorzugsweise am späten Abend, danke ich **Diane Meitzner**.

Mein Dank gilt auch **Dr. Jessica Klehm** und **Cornelia Vetter**, für die Möglichkeit am Universitätsklinikum Halle die Trenn-Dünnschlifftechnik anwenden zu können und die Unterstützung bei der Bearbeitung der unzähligen Proben.

Für die Hilfe bei histologischen Fragen, Bildbearbeitung und die Kontaktvermittlung zum Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften danke ich **Dr. Stefanie Geißler**.

**Dr. Maike Hartlage-Rübsamen** vom Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung danke ich für die Einführung zur Probenauswertung am Keyence.

Ich danke auch **Stefanie Perl**, **Lisa Wieland** und vor allem **Anja Kloker** für die Mitbearbeitung meiner Proben im Rahmen ihres Praktikums.

Bei **Dr. Dirk Hasenclever** bedanke ich mich für die Unterstützung bei der statistischen Probenauswertung.

Ich möchte auch allen **Arbeitskollegen** des MWTs danken, die mir tapfer meine Fragen beantwortet haben, mir mit Rat und Tat zur Seite standen aber auch immer Zeit für willkommene Pausen und viele angenehme Gespräche hatten.

Schließlich gilt mein Dank für die grenzenlose Unterstützung und den Rückhalt meiner **Familie** und meinem Freund **Max**.